

**ISOLETE PAULI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO EM  
COELHOS EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO  
VENENO DA ARANHA MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

**Dissertação apresentada como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre do Programa de Pós-Graduação  
em Processos Biotecnológicos, do  
Setor de Tecnologia, da Universidade  
Federal do Paraná.**

**Área de Concentração: Saúde Animal e  
Humana.**

**Orientador: Prof. Dr. Sílvio Sanches  
Veiga**

**Co-orientador: Dr. João Carlos Minozzo**

**CURITIBA  
2008**

## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos doze dias do mês de junho de 2008, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Décima Nona Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Animal e Humana. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Carlos Delfin Chavez Olortegui (UFMG), Kátia Cristina Bárbaro (Instituto Butantan), e Silvio Sanches Veiga (UFPR – orientador da dissertação).

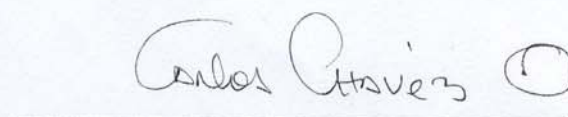
Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Isolete Pauli** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: “Avaliação do Efeito Terapêutico do Soro Antiloxoscélico em Coelho em Diferentes Intervalos de Tempo Após Exposição Experimental ao Veneno da Aranha Marrom (*Loxosceles intermédia*)”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos professores Dr Carlos Delfin Chavez Olortegui, Dr<sup>a</sup> Kátia Cristina Bárbaro e Dr Silvio Sanches Veiga, declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

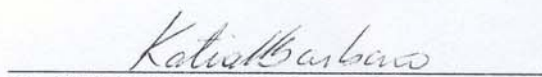
Curitiba, 12 de Junho de 2008.



Prof Dr Silvio Sanches Veiga



Prof Dr Carlos Delfin Chavez Olortegui



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Cristina Bárbaro

Eu dedico este trabalho a duas grandes mulheres:

À Arina Rodrigues da Silva pela sabedoria e amor  
Mãe você é luz em meu caminho.

À Carolina Pauli e Silva pela força e superação  
Filha você é um exemplo em minha vida.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Prof. Dr. Sílvia Sanches Veiga, por ter aceitado o encargo de me orientar e a quem neste período aprendi a conhecer, respeitar e admirar ainda mais. Deixo aqui registrada a minha gratidão.

Ao Dr. João Carlos Minozzo, meu co-orientador, pelos puxões de orelha e pelos abraços de conforto e solidariedade. Sua dedicação, espírito científico e trabalho em equipe é um exemplo para todos nós.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por possibilitar este caminho de aprendizado científico e humano, permitindo a realização deste trabalho.

O meu respeito e gratidão aos animais utilizados neste e em tantos outros trabalhos, que anonimamente tanto têm contribuído para o avanço da ciência e o bem da humanidade. Que em breve esta seja apenas uma lembrança com gratidão.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, na pessoa do Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pelo espírito empreendedor e visão de futuro.

À direção do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos-CPPI, Rubens Luiz Ferreira Gusso, Maria Inez Pizzol Correa e Rubemyr Maria Secco Chaiben, que não mediram esforços para a realização deste trabalho, pelo apoio e incentivo recebido.

A todos os funcionários do CPPI envolvidos direta ou indiretamente, aqui representados por Júlio César Padilha e Eva Braz eu agradeço toda a dedicação e espírito de equipe.

As estagiárias, Fernanda Macedo, Caroline Leal Radoski, Débora Elisa Reinke, Isabele Cristina Rosa e Natália de Brito Pawoski, pela colaboração e convivência.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique da Silva pelos esclarecimentos em hematologia, pelo apoio na conferência das lâminas e pelo bom humor com que sempre me recebeu.

À Olga Meiri Chaim, pela cooperação, espírito científico e solidariedade, em tão pouco tempo muito eu aprendi com você, obrigada por fazer parte de nossas vidas.

Às farmacêuticas, Caroline Prochaska do Laboratório de Hematologia do Hospital Erasto Gaertner, Lismar Kafka do Bomfim e Kátia Boritza dos Laboratórios de Coagulação e Bioquímica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração no atendimento as necessidades deste trabalho.

Ao Dr. José Carlos Coninck pela dedicação na análise estatística dos dados e pelas incansáveis explicações.

Aos colegas do Curso de Mestrado e Doutorado em Processos Biotecnológicos pela boa convivência, incentivo e carinho.

À Dra. Kátia Barbaro e ao Prof. Dr. Carlos Chaves-Olortégui, por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho, muito me honra suas participações.

Aos amigos, sempre tão presentes no carinho e no apoio, a minha gratidão e felicidade por compartilhar com vocês mais esta de muitas caminhadas.

***“Dê o primeiro passo com fé  
Você não precisa ver toda a escada  
Apenas suba o primeiro degrau”  
(Martin Luther King Jr.)***

## RESUMO

Os acidentes com aranhas *Loxosceles* representam um importante problema de saúde pública na América do Sul, onde há predominância das espécies *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*. A picada pela aranha induz um quadro cutâneo necrótico e menos comumente a doença sistêmica que pode ser fatal. O tratamento, ainda controverso, apresenta vários protocolos, tendo o soro antiveneno como o único tratamento específico. Procuramos avaliar neste trabalho a ação do soro antiloxoscélico na cinética do envenenamento, através de protocolo que reproduzisse o acidente com a aranha marrom (*L. intermedia*), espécie responsável pelo maior número de acidentes no Brasil. Já foi demonstrada por outros estudos a efetividade terapêutica do antiveneno quando este é aplicado precocemente (até 4 horas), portanto buscamos verificar o efeito neutralizante do soro antiloxoscélico aplicado em diferentes intervalos de tempo após envenenamento experimental e determinar até que momento a soroterapia ainda apresenta benefício terapêutico no comprometimento cutâneo e sistêmico do loxoscelismo, considerando que o paciente acidentado geralmente procura tratamento médico muitas horas após o envenenamento. Coelhos neozelandeses foram utilizados em experimentos de indução de dermonecrose e alterações sistêmicas com veneno de *L. intermedia* em dose de 2 DMN (dose mínima necrosante). A aplicação do antiveneno loxoscélico – CPPI (4 mL por animal em cinética temporal) foi capaz de minimizar os efeitos do envenenamento observados por meio de parâmetros cutâneos (eritema, edema, equimose e área necrótica) e sistêmicos (contagens de células sanguíneas e plaquetas, parâmetros hematimétricos e a dosagem de fibrinogênio) até doze horas após a inoculação do veneno. Adicionalmente houve redução parcial da área necrótica em até quarenta e oito horas. A soroterapia utilizando o antiveneno - CPPI mostrou-se capaz de interferir na progressão do quadro clínico induzido pelo envenenamento, sugerindo assim tratar-se de uma importante abordagem terapêutica para o Loxoscelismo.

Palavras-chave: *Loxosceles*. Loxoscelismo. Aranha marrom. Araneísmo necrótico. Antiveneno. Soroterapia.

## ABSTRACT

Bites by *Loxosceles* spiders are an important public health problem in South America, where the *L. laeta*, *L. gaucho* and *L. intermedia* species predominate. Spider bites induce cutaneous necrosis and, less commonly, may cause systemic illness that can be fatal. Treatment, which is still controversial, includes several protocols, and antivenin serotherapy is the only specific treatment. In this work we evaluate the action of anti-*Loxosceles* serum in the kinetics of envenomation, by means of a protocol that reproduces bites of the brown spiders (*L. intermedia*) that are responsible for most accidents in Brazil. Other studies have already demonstrated the therapeutic effectiveness of antivenin when it is applied quickly (within 4 hours) and, therefore, we evaluate the neutralizing effect of anti-*Loxosceles* serum applied at different time intervals after the experimental envenomation and determine up to which moment serotherapy still shows therapeutic benefits against cutaneous and systemic effects of loxoscelism, also considering that patients usually search for medical treatment several hours after envenomation. New Zealand rabbits were used for the experiments in which dermonecrosis and systemic alterations were induced by 2 MND (minimum necrotic dose) of venom from *L. intermedia*. The use of the CPPI (*Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos*) loxoscelic antivenin (4 mL per animal) minimized the effects of envenomation, as evaluated by cutaneous (erythema, edema, ecchymosis and necrotic area) and systemic (blood cell and platelet counts, hematimetric parameters and fibrinogen dosage) criteria, when applied up to 12 hours after venom inoculation. Also, there was a partial reduction of the necrotic area when antivenin was used up to 48 hours after the inoculation. Sero therapy with CPPI antivenin was proved to interfere with the progression of clinical symptoms induced by envenomation, suggesting that this is an important therapeutic approach against Loxoscelism.

Keywords: *Loxosceles*. Loxoscelism. Brown spider. Necrotic arachnidism. Antivenom. Serotherapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DO GRUPO CONTROLE INOCULADO COM VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	48
FIGURA 2 -	DOSAGEM DE FIBRINOGENÍO E CONTAGEM DE PLAQUETAS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E CONTROLE NORMAL.....	51
FIGURA 3 -	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E CONTROLE NORMAL.....	52
FIGURA 4 -	CONTAGEM DE ERITRÓCITOS, HEMOGLOBINA E HEMATÓCRITO NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E CONTROLE NORMAL.....	53
FIGURA 5 -	AVALIAÇÃO CINÉTICA DO ERITEMA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	54
FIGURA 6 -	AVALIAÇÃO CINÉTICA DO EDEMA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	56
FIGURA 7 -	AVALIAÇÃO CINÉTICA DA EQUIMOSE APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	57
FIGURA 8 -	AVALIAÇÃO DA NECROSE EM SEU MAIOR TAMANHO INDEPENDENTE DO TEMPO DE LEITURA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	58
FIGURA 9 -	FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 6h APÓS O ENVENENAMENTO.....	60
FIGURA 10 -	FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 12h APÓS O ENVENENAMENTO.....	62
FIGURA 11 -	FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 24h APÓS O ENVENENAMENTO.....	64
FIGURA 12 -	FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 36h APÓS O ENVENENAMENTO.....	66



FIGURA 13 - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 48h APÓS O ENVENAMENTO.....	68
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA DOSAGEM DE FIBRINOGENIO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA. EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO..	71
FIGURA 15 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE PLAQUETAS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO...	72
FIGURA 16 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO...	74
FIGURA 17 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO...	76
FIGURA 18 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE ERITRÓCITOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO...	77
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO...	78
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DO HEMATÓCRITO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	79
FIGURA 21 - FOTOS REPRESENTATIVAS DA AVALIAÇÃO DA PELE DE COELHOS DOS GRUPOS CONTROLE SORO E CONTROLE NORMAL.....	83

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	LOXOSCELISMO SISTÊMICO E OCORRÊNCIA DE LETALIDADE DE ACORDO COM A IDADE.....	29
TABELA 2 -	EVOLUÇÃO DO LOXOSCELISMO CUTÂNEO E SISTÊMICO E USO DE ANTIVENENO.....	31
TABELA 3 -	INIBIÇÃO DA LESÃO DERMONECRÓTICA EM COELHOS POR ANTIVENENO LOXOSCÉLICO EM DIFERENTES ESTUDOS.....	35
TABELA 4 -	REAÇÃO ANTIGÊNICA CRUZADA ENTRE VENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Loxosceles</i> sp DETERMINADA POR ELISA USANDO ANTIVENENO COMERCIAL BRASILEIRO.....	36
TABELA 5 -	EVOLUÇÃO DA LESÃO CUTÂNEA NO GRUPO CONTROLE VENENO APÓS INOCULAÇÃO DE 2 DMN DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	47
TABELA 6 -	VALORES DE REFERÊNCIA PARA COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA E VALORES DETERMINADO NO GRUPO CONTROLE NORMAL (valores apresentados como a média de todos os animais nos tempos avaliados $\pm$ erro padrão da média).....	50
TABELA 7 -	VALORES MÉDIOS DE ERITEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO.....	54
TABELA 8 -	VALORES MÉDIOS DO EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	55
TABELA 9 -	VALORES MÉDIOS DA EQUIMOSE OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	57
TABELA 10 -	VALORES MÉDIOS (n =12) DA DOSAGEM DE FIBRINOGÊNIO OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	70

TABELA 11 - VALORES MÉDIOS (n =12) DA CONTAGEM DE PLAQUETAS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	72
TABELA 12 - VALORES MÉDIOS (n =12) DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	74
TABELA 13 - VALORES MÉDIOS (n =12) DA CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	75
TABELA 14 - VALORES MÉDIOS (n =12) DA CONTAGEM DE ERITRÓCITOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	77
TABELA 15 - VALORES MÉDIOS (n =12) DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	78
TABELA 16 - VALORES MÉDIOS (n =12) DA DETERMINAÇÃO DE HEMATÓCRITO OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	79
TABELA 17 - VALORES MÉDIOS (n =12) DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NORMAL E CONTROLE SORO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	81

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
3.1 LOXOSCELISMO.....	20
3.2 CARACTERÍSTICAS E AÇÃO DO VENENO.....	22
3.3 TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO.....	25
3.3.1 Tratamento com Antiveneno.....	27
3.4 ESTUDOS EM HUMANOS.....	29
3.5 ESTUDOS EM ANIMAIS.....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 ANIMAIS.....	39
4.2 VENENO.....	39
4.3 ATIVIDADE DERMONECRÓTICA DO VENENO.....	40
4.4 SORO ANTILOXOSCÉLICO.....	40
4.5 PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE VENENO E SORO ANTILOXOSCÉLICO...	41
4.6 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE AVALIAÇÃO APÓS ENVENENAMENTO.....	42
4.7 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS A SEREM AVALIADOS.....	43
4.8.1 Parâmetros Cutâneos.....	43
4.8.2 Parâmetros Sistêmicos.....	43
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CUTÂNEO DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> NOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE VENENO.....	47
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> NOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE VENENO.....	50
5.3 AVALIAÇÃO CUTÂNEA DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO NO DESENVOLVIMENTO DA DERMONECROSE: ERITEMA, EDEMA, EQUIMOSE E ÁREA DERMONECRÓTICA.....	53
5.3.1 Eritema.....	53
5.3.2 Edema.....	55
5.3.3 Equimose.....	56
5.3.4 Área Dermonecrótica.....	58
5.4 AVALIAÇÃO SISTÊMICA DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO NO ENVENENAMENTO COM ÊNFASE NA HEMOSTASIA: DOSAGEM DE FIBRINOGÊNIO E CONTAGEM DE PLAQUETAS.....	70
5.4.1 Dosagem de Fibrinogênio.....	70
5.4.2 Contagem de Plaquetas.....	71
5.5 AVALIAÇÃO SISTÊMICA DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO NO ENVENENAMENTO COM ÊNFASE NA CELULARIDADE DO SANGUE PERIFÉRICO E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS: CONTAGEM DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E ERITRÓCITOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E HEMATÓCRITO.....	73

5.5.1 Contagem de Leucócitos.....	73
5.5.2 Contagem de Neutrófilos.....	75
5.5.3 Contagem de Eritrócitos, Dosagem de Hemoglobina e Hematócrito.....	76
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SORO ANTILOXÓSCÉLICO QUANDO APLICADO ISOLADAMENTE.....	80
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	84
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	90
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92
<b>ANEXOS</b> .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, também conhecidas por aranhas marrons, têm distribuição mundial, com mais de 100 espécies já descritas em vários países da Europa, África, Oceania, partes da Ásia, América do Norte, América Central e, principalmente, da América do Sul (GERTSCH, 1967; DA SILVA *et al.*, 2004; PLATNICK, 2008).

No Brasil, encontram-se registradas desde 1891, porém somente em 1954 foram imputadas como agentes causadores de acidentes, em especial nas regiões Sul e Sudeste, onde predominam as espécies *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* (EICKSTEDT, 1994; SEZERINO *et al.*, 1998; MÁLAQUE *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004). *L. laeta* é também endêmica no Peru e Chile (ZVALETA, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989).

Essas três espécies, juntamente à *L. reclusa* da América do Norte, à *L. deserta* dos Estados Unidos e do México e à cosmopolita *L. rufescens*, são consideradas as *Loxosceles* mais importantes do mundo do ponto de vista médico (GERTSCH e ENNIK, 1983; WONG *et al.*, 1987; ESCALANTE-GALINDO *et al.*, 1999; SCHENONE *et al.*, 2001).

Picada pela aranha marrom é a terceira causa entre os acidentes por animais peçonhentos no Brasil, sendo que a maioria dos acidentes ocorre com *Loxosceles intermedia* e no estado do Paraná, com 6.317 casos registrados no ano de 2007 (SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2007)

O veneno loxoscélico causa um dano tecidual caracterizado como um processo inflamatório geralmente agudo e grave, que leva à destruição do tecido e mais raramente ao óbito. Vários estudos vêm sendo realizados para isolar e caracterizar os componentes do veneno que são uma mistura altamente complexa e constituída por numerosas proteínas de ação tóxica ou enzimática de baixa massa molecular (FUTRELL, 1992; PATEL *et al.*, 1994; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; BARBARO e CARDOSO, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

O loxoscelismo é o termo utilizado para descrever as manifestações clínicas e lesões decorrentes de picadas por aranhas *Loxosceles*, sendo atualmente a forma



mais grave de araneísmo necrótico em vários países (FUTRELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; ISBISTER e WHITE, 2004), é um importante problema de saúde pública na América do Sul, com relatos de acidentes no Brasil, Chile, Peru e Argentina (SCHENONE *et al.*, 1989; RIBEIRO *et al.*, 1993; DE ROODT *et al.*, 2002; MÁLAQUE *et al.*, 2002).

O envenenamento em humanos apresenta duas variantes clínicas: o loxoscelismo cutâneo que é a forma mais comum, sendo observada em 67,9% a 100% dos casos descritos (PAULI *et al.* 2006) e o loxoscelismo cutâneo-visceral, também conhecido como loxoscelismo sistêmico, que é a forma mais grave, podendo evoluir, em alguns casos, para coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal aguda e óbito. A forma cutâneo-visceral é menos comum, podendo variar de zero a 32,1% dos casos de acordo com a região estudada e a espécie de aranha envolvida, especialmente em crianças e idosos (PAULI *et al.* 2006).

Vários protocolos para o tratamento do envenenamento loxoscélico já foram propostos e testados. Os mais utilizados no momento são a dapsona, droga utilizada no tratamento da hanseníase que tem sido recomendada para o tratamento de picadas por aranhas *Loxosceles* por se acreditar que limite a migração e infiltração neutrofílica no local da picada (SWANSON e VETTER, 2005), os corticosteróides devido à sua ação antiinflamatória (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004), os antibióticos para impedir a infecção secundária ou como quelantes inibidor de moléculas do veneno (MONTEIRO *et al.*, 2002; PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2007), bem como o soro antiveneno, o único tratamento específico para neutralizar a ação do veneno (HOGAN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2006).

Tendo em vista que estudos experimentais em animais demonstram que a maioria dos efeitos danosos do veneno ocorre entre três e seis horas após a picada da aranha *Loxosceles* (WASSERMAN e ANDERSON, 1983–1984; PATEL *et al.*, 1994; OSPEDAL *et al.*, 2002), muitos autores acabam questionando o valor do tratamento com soro antiveneno, principalmente, na prevenção do dano cutâneo, visto o tratamento geralmente ser iniciado varias horas após o acidente. Mesmo no Brasil, onde o soro antiveneno tem sido indicado com maior freqüência que em outros países, e onde o Ministério da Saúde desenvolveu manuais que visam fornecer subsídios técnicos para identificação, diagnóstico e conduta neste tipo de agravo, existem divergências quanto à sua eficácia na neutralização dos efeitos

locais e do período ideal para sua administração, fatos que determinam percentuais de uso deste medicamento bastante variáveis, na ordem de 12 a 70% em diferentes regiões do país (Ministério da Saúde, Brasil, 2001), demonstrando diferentes graus de confiança no tratamento com soro antiveneno.

Uma terapia definitiva para o tratamento do loxoscelismo ainda não está estabelecida (SWANSON e VETTER, 2006). Até o momento não existem critérios unânimes a respeito dos melhores esquemas terapêuticos, com grandes controvérsias sobre a efetividade das drogas, do soro antiveneno, e da associação entre estes (FUTRELL, 1992; PHILLIPS *et al.*, 1995; SAMS *et al.*, 2001; WENDELL, 2003; PAULI *et al.*, 2006). Portanto, perguntas como a capacidade do soro em neutralizar os efeitos locais do loxoscelismo e a correlação entre o tempo de envenenamento e eficácia da soroterapia são questões que apesar dos estudos existentes ainda não foram respondidas. Estudos em humanos prospectivos, randomizados e cegos, assim como estudos experimentais avaliando o efeito do antiveneno no comprometimento sistêmico causado por *L. intermedia* não se encontram disponíveis na literatura.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar e comparar em coelhos as alterações cutâneas e sistêmicas provocadas pelo veneno de *Loxosceles intermedia*, espécie responsável pelo maior número de acidentes no Brasil, além de avaliar o efeito neutralizante do soro antiloxoscélico aplicado em diferentes intervalos de tempo após envenenamento experimental e determinar até que momento a soroterapia ainda apresenta benefício terapêutico nos comprometimentos cutâneo e sistêmico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo determinar, em coelhos, o tempo máximo após envenenamento em que o soro antiloxoscélico apresenta efeito terapêutico, tendo como foco o comprometimento cutâneo e sistêmico causados pelo veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Estabelecer e comparar as alterações cutâneas causadas pelo envenenamento por *Loxosceles intermedia* em coelhos, tais como eritema, edema, equimose e dermonecrose.

2.2.2 Estabelecer e comparar as alterações sistêmicas em coelhos causadas pelo envenenamento por *Loxosceles intermedia* na coagulação sanguínea, na celularidade do sangue periférico, índices hematimétricos e bioquímica.

2.2.3 Determinar a efetividade do soro antiloxoscélico, aplicado em diferentes intervalos de tempo, sobre a evolução do envenenamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LOXOSCELISMO

O envenenamento por aranhas *Loxosceles* em humanos causa dois quadros clínicos principais: o loxoscelismo cutâneo ou dermonecrótico e o cutâneo-visceral ou sistêmico. Os fatores que contribuem para a evolução de um ou outro quadro não estão completamente compreendidos, acredita-se que as manifestações dependem de fatores da aranha envolvida, como espécie, sexo e variações ontogenéticas; de fatores do hospedeiro, como idade, local da picada, estado nutricional, variações genéticas e participação de diferentes mediadores endógenos da inflamação; da quantidade de veneno inoculado e do tempo para iniciar o tratamento (FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998; MÁLAQUE *et al.*, 2002; BARRETTO *et al.*, 2003; BARBARO e CARDOSO, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A primeira situação é mais comum, o loxoscelismo cutâneo, caracteriza-se pela presença de lesão cutânea dolorosa, de instalação lenta e progressiva, com edema, endurecimento, hiperemia, equimose e área mesclada de hiperemia, equimose e isquemia conhecida como placa marmórea, que pode evoluir para necrose e úlcera necrótica de lenta cicatrização ou requerer excisão cirúrgica e enxerto de pele (FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998; SAMS *et al.*, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004).

Já a forma mais grave, o loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico, caracteriza-se pela presença de alterações hematológicas e/ou dano renal associados ao quadro cutâneo, podendo evoluir, independente do curso cutâneo (MÁLAQUE *et al.*, 2002; BARBARO e CARDOSO, 2003), com hemólise, trombocitopenia, icterícia, hematúria, hemoglobinúria, rabdomiólise, distúrbios eletrolíticos, choque e, em alguns casos, coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal aguda, as principais causas de óbito por loxoscelismo (ZAVALETA, 1987; FUTRELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002; HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2007).

A maioria dos casos fatais ocorre em crianças e/ou geralmente associados a espécies como a *L. laeta*, possivelmente com veneno mais tóxico (FUTRELL, 1992; GONÇALVES DE ANDRADE e TAMBOURGI, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005),

enquanto lesões relativamente leves estão mais associadas a espécies como a *L. deserta*, *L. arizonica* e *L. rufescens* da América do Norte (SAMS *et al.*, 2001).

Estudos realizados por SCHENONE (2003), apontam para índices de letalidade de 3,6% para os casos de loxoscelismo envolvendo a espécie *L. laeta*, sendo relatados índices de letalidade de 0,2% (RIBEIRO *et al.*, 1993) e 0,4% (MARQUES DA SILVA, 2002) para acidentes com *L. intermedia*.

Embora mais raras, podem ocorrer formas benignas, consistindo em lesões papulares ou vesiculares pruriginosas (ALARIO *et al.*, 1987; ANDERSON, 1991) ou em um quadro bem conhecido de loxoscelismo de predomínio edematoso, caracterizado por hiperemia e edema acentuados, sem evolução para necrose, especialmente em pacientes picados em região facial (FUTRELL, 1992; BARRETT *et al.*, 1994; SCHENONE *et al.*, 2001; BARBARO e CARDOSO, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004).

Além disso, podem ocorrer tanto no quadro cutâneo, porém mais freqüentes e intensas nos quadros de loxoscelismo cutâneo-visceral (ZAVALETA, 1987; SAMS *et al.*, 2001; SCHENONE *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004), manifestações gerais inespecíficas como mal-estar geral, fraqueza, febre, calafrios, cefaléia, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia, visão turva, alterações de nível de consciência, irritabilidade, *rash* cutâneo generalizado e pruriginoso e petéquias (FUTRELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002; HOGAN *et al.*, 2004).

O diagnóstico dos acidentes loxoscélicos é fundamentalmente clínico-epidemiológico, baseado na análise cuidadosa da história e dos sinais e sintomas clínicos apresentados, associados à identificação da aranha e/ou à possibilidade de contato da pessoa com a aranha em seu meio e à exclusão de outras etiologias, como picadas por outros insetos, infecções, dermatites e vasculites (FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998; SAMS *et al.*, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002; WENDELL, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; ISBISTER e WHITE, 2004; SWANSON e VETTER, 2005).

Realizam-se, na suspeita de loxoscelismo sistêmico, exames de sangue como hemograma, estudo de coagulação sanguínea e bioquímica, e exames de urina (SCHENONE *et al.*, 1989; SEZERINO *et al.*, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002, DE SOUZA *et al.*, 2007), mas não existem exames laboratoriais específicos ou que definam diagnóstico ou prognóstico (CACY

e MOLD, 1999; BARBARO e CARDOSO, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004, DE SOUZA *et al.*, 2007).

Alguns testes visando à detecção do veneno circulante (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998) e em lesões de pacientes (AKDENIZ *et al.*, 2007), assim como em modelo experimental (MILLER *et al.*, 2000; GOMEZ *et al.*, 2002; KRYWKO e GOMEZ, 2002) têm sido estudados, com potencial para aplicação futura, mas ainda não existem exames para diagnóstico laboratorial disponível comercialmente e com suficiente correlação clínica (DA SILVA *et al.*, 2004).

A identificação da espécie de *Loxosceles* causadora do acidente é um importante fator para determinação da evolução clínica, do prognóstico e para direcionamento do tratamento, pois se observam diferenças importantes quanto à composição protéica dos venenos, experimentalmente associadas com variáveis graus de toxicidade, que pode refletir nas diferentes apresentações clínicas e na severidade do envenenamento (GUILHERME *et al.*, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005), sendo recomendado o uso de antiveneno que apresente anticorpos específicos para a espécie em questão.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS E AÇÃO DO VENENO

Vários estudos vêm sendo realizados com objetivo de isolar e caracterizar os vários componentes dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, que são altamente complexos e constituídos por numerosas proteínas de ação tóxica ou enzimática de baixas massas moleculares numa faixa de 5 KDa a 40kDa (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Diversos constituintes incluindo hialuronidases, serino-proteases, metaloproteases e esfingomielinases-D já foram identificados (ELGERT *et al.*, 1974; FUTRELL, 1992; BARBARO *et al.*, 1996a; BARBARO *et al.*, 1996b; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000b; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; BARBARO e CARDOSO, 2003; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Estando a atividade dermonecrótica e letal dos venenos de *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*, situada nas regiões de massas moleculares entre 32 KDa e 35 kDa (BARBARO *et al.*, 2005). Também foi demonstrado ser o veneno de *L. intermedia* o mais letal dos três quando inoculado em camundongos (BARBARO *et al.*, 1996a).

Algumas atividades nocivas do veneno podem ser atribuídas a toxinas proteolíticas, as quais degradam colágeno, fibrinogênio, fibronectina, entactina e



proteoglicano heparan sulfato, e, por sua vez, desestabilizam as matrizes extracelulares, como as membranas basais, resultando em hemorragia local e espalhamento gravitacional nas lesões cutâneas e comprometimento sistêmico, envolvendo coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999, 2000b, 2001; LUCIANO *et al.*, 2004).

Um dos componentes mais estudados e importantes para o estabelecimento da lesão dermonecrótica são as toxinas denominadas dermonecróticas da família das esfingomielinases-D, recentemente reclassificadas como fosfolipases-D, devido a sua capacidade de hidrolisar glicerofosfolipídios além de esfingomielina (LEE e LYNCH, 2005). As toxinas dermonecróticas induzem toxicidade e interação com a membrana das células endoteliais e tubulares renais, aumentam a permeabilidade capilar, causam agregação plaquetária e migração de leucócitos polimorfonucleares, podendo promover a dermonecrose no local da picada, desencadear reações envolvendo componentes do sistema complemento, como também a hemólise intravascular (FUTRELL 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; TAMBOURGI *et al.*, 1998 e 2007; DA SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

As hialuronidases são outros constituintes do veneno capazes de hidrolizar o ácido hialurônico, as quais em associação às metaloproteases, podem ser responsáveis pela desorganização da matriz extracelular e conseqüente aumento do tamanho da lesão pelo espalhamento gravitacional provocado, este, uma das características do envenenamento por *Loxosceles* (FUTREL 1992; BARBARO *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

Os estudos histopatológicos em animais demonstram que a maioria dos efeitos nocivos do veneno como: diapedese intensa e acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor dos vasos, presença de eritrócitos extravasculares e desorganização das fibras de colágeno do tecido conectivo denso, com subseqüente edema da derme e epiderme, vasodilatação e hemorragia subcutânea ocorrem nas primeiras 24 horas após a picada da aranha *Loxosceles* (WASSERMAN e ANDERSON, 1983, 1984; OSPEDAL *et al.*, 2002, DA SILVA *et al.*, 2003).

A ação do veneno sobre os neutrófilos, que parece ser a causa principal da necrose, parece não ser direta, este possivelmente ao atuar sobre o endotélio vascular, ativa de forma desregulada a migração dos neutrófilos circulantes (DA SILVA *et al.*, 2004). Já, a presença de trombina e histamina no local da picada induz

simultaneamente a expressão na superfície da célula endotelial do fator de ativação de plaquetas e de P-selectinas, tornando o neutrófilo ativado e induzindo agregação plaquetária (PATEL *et al.*, 1994). A célula endotelial ativada também produz várias citocinas, entre elas grande quantidade de IL-8, a qual é um potente mediador da ativação e migração de neutrófilos (PATEL *et al.*, 1994). Os neutrófilos ativados passam por entre as junções das células endoteliais, dirigem-se ao tecido lesionado desencadeando o processo inflamatório, caracterizando o quadro dermonecrótico que pode evoluir ou não para o sistêmico.

A atividade hemolítica da fosfolipase foi estudada por TAMBOURGI *et al.* (2000) que propuseram o mecanismo de indução da hemólise dependente de complemento, pelo veneno da *L. intermedia*, induz a ativação de uma metaloprotease endógena, a qual faz a clivagem de glicoforinas dos eritrócitos, fazendo com que estes fiquem suscetíveis à lise pelo complemento humano. Já ZANETTI *et al.* (2002), propõem que os distúrbios hemorrágicos sistêmicos e locais do loxoscelismo são conseqüências da fibrinogenólise direta do veneno.

LUCIANO *et al.* (2004) demonstraram em camundongos, a atividade nefrotóxica direta do veneno de *L. intermedia*, através das alterações observadas nas estruturas glomerulares e tubulares. De modo geral, tanto a porção medular quanto a cortical do tecido renal apresentaram um padrão difuso de citotoxicidade e os animais testados apresentaram concentração aumentada de uréia na urina. Biópsia renal de camundongos tratados com a LiRecDT1 (*Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin 1*) demonstraram alterações histológicas semelhantes ao efeito nefrotóxico do veneno total, incluindo edema glomerular e necrose tubular. A presença da LiRecDT1 ligada diretamente ao tecido renal corrobora com a possibilidade de dano renal direto pela toxina dermonecrótica (CHAIM *et al.*, 2006).

O veneno de *L. intermedia* em estudo realizado em ratos demonstrou efeito hepatotóxico agudo em seis horas após a inoculação do veneno total, com alterações histológicas e do metabolismo hepático, e aumento significativo das transaminases. Já, quando foi utilizado a toxina dermonecrótica LiRecDT1, apenas alterações histológicas com presença da toxina nos tecidos foram observadas, sugerindo que a fosfolipase-D é importante para os efeitos hepatotóxicos, mas não é a única proteína responsável (CHRISTOFF, 2008).

Apesar do grande número de estudos realizados, os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do envenenamento e na ação do veneno ainda não estão

totalmente elucidados (SAMS *et al.*, 2001; BARBARO e CARDOSO, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004, PALUDO *et al.*, 2006), pois o loxoscelismo é um processo multifatorial que envolve ações diretas do veneno sobre os tecidos e respostas do organismo às agressões causadas pelo mesmo (BARBARO E CARDOSO, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004, HOGAN *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2007).

### 3.3 TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO

Vários tipos de terapias já foram propostas e testadas para o envenenamento loxoscélico, como cuidados locais, analgésicos, aspirina, heparina, fentolamina, vasodilatadores, dextran, nitroglicerina tópica, choque elétrico, oxigênio hiperbárico, anti-histamínicos, antibióticos, corticóides (parenterais, orais, intralesionais e tópicos), excisão cirúrgica, antiveneno (parenteral ou intralesional) e dapsona (FUTRELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001; WENDELL, 2003; ISBISTER *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2005, PAULI *et al.*, 2006). No entanto, as pesquisas foram inconclusivas, com poucas evidências para suportar essa variedade de tratamentos (FUTRELL, 1992; PHILLIPS *et al.*, 1995; SAMS *et al.*, 2001; WENDELL, 2003; SWANSON e VETTER, 2006).

As ações terapêuticas habitualmente utilizadas em diferentes países são estabelecidas de acordo com a experiência regional e características do envenenamento, sendo as mais utilizadas os antibióticos profiláticos, os corticóides, a dapsona e antiveneno, o único tratamento específico.

Em países como os Estados Unidos, lesões necróticas são geralmente tratadas com antibióticos orais para prevenção de infecção (HOGAN *et al.*, 2004), visto a infecção aumentar marcadamente a temperatura no local da picada e assim, a atividade de enzimas responsáveis pela dermonecrose e pelo processo inflamatório, podendo cursar com lesões de lenta evolução e difícil cicatrização (KING Jr., 1985). Entretanto, em outros países, a administração de antibióticos não é rotina, já que a infecção secundária não é freqüente (SEZERINO *et al.*, 1998; SCHENONE *et al.*, 2001; MÁLAQUE *et al.*, 2002; SCHENONE, 2003; BARBARO e CARDOSO, 2003), e alguns autores consideram seu uso inapropriado na ausência de evidências de infecção, sendo reservado como profilaxia quando houver solução de continuidade (KING JR., 1985; REES *et al.*, 1987; ESCALANTE-GALINDO *et al.*, 1999; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE CURITIBA, BRASIL, 2002;

WENDELL, 2003; HOGAN *et al.*, 2004). No entanto, PAIXÃO-CAVALCANTE *et al* (2007), relatam que o tratamento tópico com tetraciclina, quelante de metais divalentes, reduziu significativamente a progressão da dermonecrose em coelhos expostos ao veneno loxoscélico.

Embora não existam dados suficientes para sustentar o seu uso no loxoscelismo cutâneo ou cutâneo-visceral, os corticóides sistêmicos têm sido indicados em casos severos, especialmente em crianças, pois teriam efeito de proteção renal e prevenção de hemólise se administrados precocemente (SMITH e BALDWIN, 1988; FUTRELL, 1992; GOMEZ *et al.*, 1999; WENDELL 2003). Mesmo quando administrados de forma precoce, não previnem o desenvolvimento de necrose e úlceras necróticas, sendo reservados para pacientes com problemas sistêmicos (MASTERS *et al.*, 1998; GODDARD, 1998; SAMS *et al.*, 2001; WENDELL, 2003; HOGAN *et al.*, 2004, SWANSON e VETTER, 2006).

Já a dapsona tem sido recomendada para o tratamento de picadas por aranhas *Loxosceles* porque se acredita que limite à migração e infiltração neutrofílica no local da picada, um fator essencial para o desenvolvimento das lesões dermonecroticas, podendo diminuir o dano tecidual mediado por neutrófilos e promover importante redução na endureção e necrose (KING Jr., 1985; REES *et al.*, 1987; ANDERSON, 1991; BARRETT *et al.*, 1994; GODDARD, 1998; SAMS *et al.*, 2001, DA SILVA *et al.*, 2004). Entretanto, seus efeitos colaterais podem ser severos, incluindo hemólise, e necessitando de administração sob supervisão (WRIGHT *et al.*, 1997; MASTERS *et al.*, 1998), não há indicação em casos sistêmicos, e alguns autores questionam sua eficácia, referindo que não tem demonstrado benefícios em estudos experimentais ou quando administrada muitas horas após a picada (ZAVALETA, 1987; FUTRELL, 1992; PHILLIPS *et al.*, 1995; WENDELL, 2003; HOGAN *et al.*, 2004).

Na América do Sul, a considerável morbidade e mortalidade dos acidentes loxoscélicos levou ao desenvolvimento e uso de terapia específica com antivenenos, utilizados com maior frequência no Brasil, em lesões cutâneas graves ou na presença de doença sistêmica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2001; HOGAN *et al.*, 2004). De todas as intervenções propostas, o soro antiveneno vem sendo citado como o medicamento de maior potencial se administrado nas primeiras horas após o envenenamento (REES *et al.*, 1981; FUTRELL, 1992; GOMEZ *et al.*, 1999; HOGAN *et al.*, 2004). Entretanto, não existem estudos clínicos padronizados disponíveis,

permanecendo dúvidas sobre sua real capacidade de neutralização dos efeitos locais do loxoscelismo e do período ideal para sua administração (BARBARO e CARDOSO, 2003; ISBISTER e WHITE, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2004).

### 3.3.1 Tratamento com Antiveneno

O soro antiloxoscélico, desenvolvido por Vellard em 1954 (BARBARO e CARDOSO, 2003) passou a ser produzido no Brasil a partir da década de 1960 (FURLANETTO, 1961) e, atualmente, são disponibilizados pelo Ministério da Saúde dois antivenenos: o soro antiloxoscélico e o soro anti-aracnídico. O soro antiloxoscélico é o soro poliespecífico produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná, Brasil, contendo anticorpos contra os venenos das três espécies de aranhas *Loxosceles* mais importantes do ponto de vista médico no país: *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*. O soro anti-aracnídico, do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, é produzido a partir de venenos das aranhas *Loxosceles gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus*, isto é, contém na mistura de imunização, veneno de *Loxosceles*. Além desses, existem dois outros produtores comerciais de antiveneno loxoscélico, o Instituto Nacional de Saúde de Lima, no Peru, e o Instituto Bioclon, no México (HOGAN *et al.*, 2004).

Esses soros são imunoglobulinas heterólogas, fração F(ab')<sub>2</sub> de origem eqüina, portanto, não se trata de um tratamento isento de riscos, pela possibilidade de complicações como choque anafilático ou doença do soro (HOGAN *et al.*, 2004). Como demonstrado em estudos realizados em São Paulo e Santa Catarina, Brasil (MÁLAQUE *et al.*, 2002; SEZERINO *et al.*, 1998), foram observadas reações precoces em cerca de 20% e 6,5% dos pacientes que receberam soroterapia, respectivamente, porém foram reações brandas (urticária e náuseas), sem risco de vida, prontamente revertidas com medidas adequadas. A melhoria no processo de obtenção e purificação dos soros antivenenos (THEACKSTON *et al.*, 2003) tem reduzido significativamente os percentuais de reações adversas. Em relatório de farmacovigilância encaminhado pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA em outubro de 2007, dos 17.005 frascos de soro antiloxoscélico-CPPI distribuídos de 2002 a junho

de 2007 foram relatados sete casos de reações adversas, destes sendo confirmados três casos e nenhum choque anafilático. O monitoramento do uso do soro foi realizado através do sistema nacional de notificações de eventos adversos de imunobiológicos (EAV), de comunicação com os responsáveis pelos programas de imunização nos estados que receberam o soro antiloxoscélico-CPPI e da avaliação das fichas de notificação de acidentes peçonhentos no estado do Paraná.

A soroterapia antiveneno tem como finalidade a neutralização da maior quantidade possível de veneno circulante, acreditando-se que reduza o risco de envenenamento sistêmico e complicações potencialmente fatais como hemólise, insuficiência renal e coagulação intravascular disseminada, além de reduzir o dano local e encurtar o tempo de convalescença.

SCHENONE *et al.* (2001) referem que o veneno loxoscélico atua de forma rápida sobre as estruturas celulares pelas quais, supostamente, tem maior afinidade, deixando de seguir circulando. Acredita-se, desse modo, que os danos sejam cutâneos ou viscerais, instalam-se no momento da picada e manifestam-se horas após e que, portanto, não há veneno livre que possa ser neutralizado pelo antiveneno (SCHENONE *et al.*, 1989; SCHENONE *et al.*, 2001). No entanto, foi demonstrado por CARDOSO *et al.* (1990) que o veneno pode permanecer no local da inoculação por até 29 dias, particularmente em áreas do tecido adiposo. Assim, o papel do antiveneno talvez não seja só o de atuar na lesão original, mas sim na eliminação do veneno residual e no favorecimento da cicatrização (FUTREL, 1992).

No Brasil, o soro anti-aracnídico ou antiloxoscélico, em associação com a administração de corticóides, constituem a terapia mais utilizada (GUILHERME *et al.*, 2001). O Ministério da Saúde orienta o seu uso nos casos considerados moderados e graves ou doença sistêmica, para diminuir a severidade da reação e encurtar o tempo de cicatrização, dependendo de quão cedo seja sua administração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2001; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE CURITIBA, BRASIL, 2002; BARBARO e CARDOSO, 2003; HOGAN *et al.*, 2004). Entretanto, segundo ISBISTER *et al.* (2003) e SAWANSON e VETTER (2006) há poucas evidências que suportem essa efetividade, particularmente contra efeitos locais, uma das principais controvérsias presente na literatura.

Mesmo no Brasil, onde o soro antiveneno tem sido indicado com maior frequência que em outros países, divergências quanto à eficácia do soro na neutralização dos efeitos locais e do período ideal para sua administração



determinam percentuais de uso deste medicamento na ordem de 11,9%, 46,8%, 54,9% e 70% em diferentes estados do país como Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2001).

### 3.4 ESTUDOS EM HUMANOS

Estudos retrospectivos realizados no Brasil, Chile, Peru, México e Estados Unidos, em associação com estudos prospectivos e alguns relatos de casos revisados (PAULI *et al.*, 2006) demonstraram que os acidentes Loxoscélicos atingem mais comumente adultos, na faixa entre 20 e 50 anos de idade, com discreto predomínio em mulheres, em dias ou períodos mais quentes do ano, como nos meses de primavera e verão.

Em todos os estudos revisados (PAULI *et al.*, 2006), houve maior incidência de loxoscelismo cutâneo (quadro 1). Nos locais onde a *L. reclusa* foi a espécie predominante não houve óbitos registrados, apesar de WRIGHT *et al.* (1997) relatarem 1,8% de casos sistêmicos pela mesma espécie, no Tennessee.

Já o loxoscelismo sistêmico ocorreu com maior freqüência em locais em que a *L. laeta* é a espécie predominante, como no Chile, no Peru e no Estado de Santa Catarina, Brasil (tabela 1). Nesses locais, foi observado maior número de pacientes com idade inferior a 15 anos, atingindo 33% em Santa Catarina, Brasil (SEZERINO *et al.*, 1998) e 100% no Chile (SCHENONE *et al.*, 2001), onde também foi observada a maior letalidade, de 1,5% e 7,1% respectivamente.

TABELA 1 CONTINUA – LOXOSCELISMO CUTÂNEO E SISTÊMICO E OCORRÊNCIA DE LETALIDADE DE ACORDO COM A IDADE

Local (Período)	Espécie Predominante	n	LC (%)	LS (%)	Óbito/n (%)	Óbito/SL (%)	Idade
Paraná, Brasil (1989–1990)	<i>L. intermedia</i>	923	NR	NR	0.2	NR	20.7% <20
Rio Grande do Sul, Brasil (1987–1988)	<i>Loxosceles sp.</i>	64	84.4	15.6	1.5	10	NR
Rio Grande do Sul, Brasil (1989)	<i>Loxosceles sp.</i>	116	78	22	0	0	26.5% <20
São Paulo, Brasil (1985–1996)	<i>L. gaucho</i>	359	96.4	3.6	0	0	7% <15
Santa Catarina, Brasil (1985–1995)	<i>L. laeta</i>	267	86.9	13.1	1.5	11.4	33% <15
Santiago, Chile (1955–1988)	<i>L. laeta</i>	216	84.3	15.7	3.7	23.5	26.8% <20

TABELA 1 CONCLUSÃO – LOXOSCELISMO CUTÂNEO E SISTÊMICO E OCORRÊNCIA DE LETALIDADE DE ACORDO COM A IDADE

Local (Período)	Espécie Predominante	n	LC (%)	LS (%)	Óbito/n (%)	Óbito/SL (%)	Idade
Santiago, Chile (1955–2000)	<i>L. laeta</i>	56	67.9	32.1	7.1	22.2	100% <15
Santiago, Chile (1955–2000)	<i>L. laeta</i>	250	81.2	18.8	3.6	19.1	NR
Lima, Peru (1943–1981)	<i>L. laeta</i>	279	72.8	27.2	NR	NR	NR
Ciudad de Mexico, Mexico (1994–1997)	<i>L. reclusa</i>	11	100	0	0	0	100% <15
Oklahoma, EUA (1996–1998)	<i>L. reclusa</i>	149	100	0	0	0	17% <20
Oklahoma, EUA (1995–2000)	<i>L. reclusa</i>	254	100	0	0	0	17% <20
Tennessee, EUA (1993–1995)	<i>L. reclusa</i>	111	98.2	1.8	0	0	NR

FONTE: ADAPTADO DE PAULI *et al.* (2006)

NOTA: NR= Não Relatado; n=Número de pacientes; LC= Loxoscelismo Cutâneo;

LS= Loxoscelismo Sistêmico

Exceto nas séries apresentadas por SCHENONE *et al.* (1989 e 2001), em que aproximadamente 70% dos casos foram atendidos precocemente, poucos pacientes procuraram atendimento médico até 24 horas após o acidente. Na maioria dos estudos avaliados, os sintomas começaram algumas horas após a picada, acentuando-se em torno de 24 a 72 horas, quando os pacientes então procuraram atendimento (PAULI *et al.*, 2006).

Quanto ao tratamento, foram utilizados nos estudos revisados, predominantemente, corticóides sistêmicos, associados ou não a analgésicos e anti-histamínicos, especialmente nos estudos realizados no Chile, em que praticamente todos os pacientes foram tratados com corticóides, associados a anti-histamínicos nos casos cutâneos, ou a medidas de suporte, em casos sistêmicos (SCHENONE *et al.*, 1989; SCHENONE *et al.*, 2001; SCHENONE, 2003). No Brasil, os corticóides foram administrados a 30% dos pacientes, em média, similar ao observado nos estudos de Oklahoma, EUA (PAULI *et al.*, 2006).

O segundo medicamento mais utilizado foi o antiveneno (PAULI *et al.*, 2006), preferencialmente nos estados brasileiros, em que cerca de 60% dos pacientes atendidos entre 1984 e 1996 receberam soro endovenoso, em contraste com 3,5% dos pacientes no Chile, tabela 2.

Já os antibióticos foram mais utilizados nos Estados Unidos, administrados profilaticamente a 70% dos pacientes, enquanto no México e em Santa Catarina,

Brasil foram administrados a 63,6% e 38,5% respectivamente, por quadro de infecção secundária, de pequena incidência nos outros grupos avaliados.

A dapsona foi prescrita a todos os pacientes no México (ESCALANTE-GALINDO *et al.*, 1999), mas no restante foi pouco utilizada em média por 19,5% dos pacientes, aproximadamente 16% nos Estados Unidos e 30% em São Paulo (MÁLAQUE *et al.*, 2002).

Na evolução, observou-se a presença de necrose em proporções homogêneas em locais onde há predomínio da mesma espécie, como no Chile e em Santa Catarina, Brasil, onde a *L. laeta* é a espécie predominante. O maior percentual de evolução para necrose é observado no estudo realizado por MELLO DA SILVA *et al.* (1990) no Rio Grande do Sul, Brasil, (tabela 2), onde a espécie predominante é a *L. intermedia* (MARQUES, M. G. B. Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 30/06/2008. Informação verbal).

TABELA 2 – EVOLUÇÃO DO LOXOSCELISMO CUTÂNEO E SISTÊMICO E USO DE ANTIVENENO

Local (n)	Espécie	Necrose (%)	Úlcera (%)	LS (%)	Óbito/n (%)	Óbito/LS (%)	AV (%)
Paraná, Brasil (923)	<i>L. intermedia</i>	NR	NR	NR	0.2	NR	37.0
Rio Grande do Sul Brasil (64)	<i>Loxosceles sp.</i>	NR	NR	15.6	1.5	10.0	100.0
Rio Grande do Sul Brasil (116)	<i>Loxosceles sp.</i>	85.0	NR	22.0	0	0	85.1
São Paulo, Brasil (359)	<i>L. gaucho</i>	29.1	29.1	3.6	0	0	66.0
Santa Catarina Brasil (267)	<i>L. laeta</i>	56.9	NR	13.1	1.5	11.4	46.8
Santiago, Chile (216)	<i>L. laeta</i>	50.9	35.1	15.7	3.7	23.5	3.7
Santiago, Chile (56)	<i>L. laeta</i>	66.0	45.0	32.1	7.1	22.2	3.6
Santiago, Chile (250)	<i>L. laeta</i>	55.2	38.0	18.8	3.6	19.1	3.2
Lima, Peru (279)	<i>L. laeta</i>	NR	NR	27.2	NR	NR	NR
Ciudad de Mexico Mexico (11)	<i>L. reclusa</i>	45.5	NR	0	0	0	0
Oklahoma, United States (149)	<i>L. reclusa</i>	40.0	NR	0	0	0	0
Oklahoma, United States (254)	<i>L. reclusa</i>	NR	NR	0	0	0	0
Tennessee, United States (111)	<i>L. reclusa</i>	37%	NR	1.8	0	0	0

FONTE: ADAPTADO DE PAULI *et al.* (2006)

NOTA: NR= Não Relatado; n=Número de Pacientes; LS= Loxoscelismo Sistêmico

AV= Antiveneno

SCHENONE *et al.* (1989) referem que a hemólise e as ulcerações de pele que evoluem lentamente deixando seqüelas cicatriciais têm sido observadas, apesar do tratamento específico com antiveneno. No entanto, resultados diferentes foram observados no estudo realizado por MÁLAQUE *et al.* (2002) em São Paulo, Brasil. Onde o antiveneno específico ou polivalente foi administrado por via endovenosa a todos os pacientes que procuraram atendimento em até 72 horas após a picada e não apresentavam dermonecrose na admissão, ou seja, a 237 dos 359 pacientes avaliados, sendo o antiveneno administrado em associação com corticóides em 47% dos casos e dapsona em 30%. Dos 237 pacientes que receberam soro antiloxoscélico, apenas 69 (29,1%) desenvolveram necrose, em contraste com 168 (70,9%) que não tiveram necrose, úlceras necróticas ou seqüelas cicatriciais, não havendo registro de insuficiência renal aguda, coagulação intravascular disseminada ou óbitos, apesar de 13 (3,6%) pacientes terem desenvolvido quadro cutâneo-hemolítico (tabela 2).

No estudo de SEZERINO *et al.* (1998), mais equivalente aos estudos realizados no Chile (SCHENONE *et al.*, 1989; SCHENONE *et al.*, 2001; SCHENONE, 2003) pela predominância da *L. laeta* na região, foram observadas incidências semelhantes de loxoscelismo cutâneo-hemolítico e necrose, porém diferenças quanto ao número de pacientes que receberam antiveneno e quanto ao número de óbitos, sendo este último aproximadamente o dobro nos estudos do Chile (tabela 2). Entretanto, não se sabe se essa diferença deve-se às diferentes abordagens terapêuticas, a variações entre as populações estudadas ou a outros fatores, pois não há informações detalhadas nos estudos abordados na tabela 2 que permitam correlacionar o tipo de tratamento recebido com a evolução do quadro de loxoscelismo.

### 3.5 ESTUDOS EM ANIMAIS

As lesões provocadas pelas toxinas da aranha marrom podem ser reproduzidas experimentalmente (MACHIAVELLO, 1947). Em camundongos, as toxinas do veneno provocam danos hepáticos, renais, cardíacos e de sistema nervoso central, com morte dos animais sem, no entanto, causar a dermonecrose (BABCOCK *et al.*, 1981), que é encontrada em coelhos, cobaias e humanos. Há um consenso de opinião de que a patogenia do dano local do tecido, causado pelo

veneno da *Loxosceles*, segue um caminho universal comum entre as espécies (BARBARO *et al.*, 2005), assim como a presença da enzima fosfolipase-D nas espécies de interesse médico (BINFORD e WELLS, 2003; BARBARO *et al.*, 2005).

Estudos com modelos animais têm demonstrado o valor potencial do soro antiveneno no tratamento dos acidentes loxoscélicos (FURLANETTO, 1961; REES, 1981; BRAVO *et al.*, 1994; BRAZ *et al.*, 1999; GOMEZ *et al.*, 1999; GUILHERME *et al.*, 2001 e BARBARO *et al.*, 2005). Como já colocado, uma das questões a serem respondidas no loxoscelismo é o tempo ideal para se aplicar a soroterapia. E neste sentido, vários estudos buscaram correlacionar através de diferentes protocolos o tempo de envenenamento com a aplicação do antiveneno (FURLANETTO, 1961; REES, 1981; BRAVO *et al.*, 1994; GOMEZ *et al.*, 1999; GUILHERME *et al.*, 2001; DE ROODT *et al.*, 2007), conforme mostra a tabela 3.

FURLANETTO (1961) é reconhecido pela produção do primeiro soro antiloxoscélico em escala e padronização adequada à distribuição para fins terapêuticos. Tendo estabelecido desta forma a metodologia para a titulação deste soro, com base na Unidade Anti-necrosante (UA), que corresponde à menor quantidade de soro antiloxoscélico que inoculado por via intravenosa é capaz de neutralizar totalmente o efeito de uma Dose Mínima Necrosante (DMN) de veneno. Neste estudo, foi demonstrado ser o coelho o modelo animal que melhor reproduz os sinais do envenenamento cutâneo no homem por aranhas *Loxosceles*. Avaliando o efeito do soro anti *L. rufescens* aplicado após a inoculação do veneno de *L. rufipes*, observou-se que o antiveneno ministrado até 4 horas após o envenenamento foi capaz de inibir completamente a formação de lesão dermonecrótica, e conferir inibição parcial da lesão quando aplicado 8, 16 e 24 horas após o veneno, quando comparado com os animais controle (Tabela 3). Estudos citogenéticos realizados na época sugerem que as aranhas utilizadas neste estudo provavelmente eram variações da mesma espécie.

Já no estudo de BRAVO *et al.* (1994), utilizando uma dose mínima necrosante de veneno de *L. laeta* inoculado por via intradérmica, a ausência de lesão cutânea foi observada somente quando o soro antiveneno foi administrado concomitantemente. A aplicação de soro uma hora após o veneno inibiu completamente a lesão dermonecrótica, porém não evitou a reação inflamatória.

Comparando antiveneno específico injetado intradermicamente no local da lesão, excisão cirúrgica, heparina e esteróides, REES *et al.* (1981), observaram que

o método mais efetivo para evitar os efeitos tóxicos do veneno de *L. reclusa* foi o antiveneno. Este, quando administrado até 6 e 12 horas após o envenenamento mostrou que achados microscópicos de oclusão de vasos, infiltração de PMN e necrose estavam presentes, porém reduzidos quando comparado aos coelhos controle. O efeito do veneno parece ser dependente da dose, uma vez que doses progressivamente maiores de antiveneno inibiram a quantidade inicial de eritema, sendo o antiveneno também tempo dependente.

GOMEZ *et al.* (1999) verificaram que fragmentos Fab de imunoglobulinas anti *L. reclusa*, injetados intradermicamente no local da injeção do veneno inibiram em coelhos a inflamação dérmica e a necrose associada com o envenenamento em até 4 horas, porém não se observou inibição da lesão quando administrados 8 horas após o veneno. Entretanto, o próprio autor formula as seguintes perguntas: grupos grandes e condições otimizadas de estudo poderiam demonstrar a eficácia por períodos mais longos de tempo após o envenenamento? Se o veneno de fato migra da área de envenenamento inicial, o antiveneno administrado parenteralmente forneceria melhor acesso ao veneno e assim melhor neutralização? Finalmente, poderia o antiveneno intralesional ser uma opção terapêutica útil naqueles indivíduos com forma sistêmica de loxoscelismo?

A neutralização da dermonecrose e atividade letal e as diferenças entre as principais proteínas tóxicas de *L. gauchoi*, *L. laeta* e *L. intermedia* foram estudadas utilizando anticorpos monoclonais produzidos contra o componente dermonecrótico de 35 kDa do veneno de *L. gauchoi* por GUILHERME *et al.* (2001). O anticorpo MoALg1 quando testado em camundongos, neutralizou a atividade letal do veneno homólogo, porém falhou na neutralização dos venenos de *L. laeta* e *L. intermedia*. Quando avaliado em relação à neutralização da dermonecrose em coelhos, o anticorpo apresentou eficácia de 97% quando injetado por via intravenosa seis horas após a inoculação do veneno homólogo. No entanto, falhou novamente na neutralização dos venenos de *L. laeta* e *L. intermedia*, sugerindo que diferentes epítomos estão presentes na proteína responsável pela dermonecrose e confirmando a participação de outros componentes do veneno durante o processo de reação local. Um soro policlonal eqüino anti *L. gauchoi* também foi utilizado neste experimento apresentando inibição de 76% da atividade dermonecrótica do veneno homólogo quando administrado 12 horas após o envenenamento.

TABELA 3 – INIBIÇÃO DA LESÃO DERMONECRÓTICA EM COELHOS POR ANTIVENENO LOXOSCÉLICO EM DIFERENTES ESTUDOS

Veneno		Antiveneno		Inibição da Lesão	Estudo
Espécie	Adm	Tipo	Adm		
<i>L. rufipes</i> *	ID	Ac policlonal equino Anti <i>L. rufescens</i> *	IV	Antiveneno até 4h = inibição total da dermonecrose Até 8h = quase total 16 a 24 horas = 50%	Furlanetto, 1961
<i>L. reclusa</i>	ID	Ac policlonal de coelho Anti <i>L. reclusa</i>	ID intralesional	Antiveneno 6 a 12 h = atenuação parcial dos sinais microscópicos da lesão 24 h = fraca atenuação	Rees <i>et al.</i> , 1981
<i>L. laeta</i>		Ac policlonal equino Anti <i>L. laeta</i>	IV	Antiveneno 1h = inibição completa da dermonecrose, mas não da reação inflamatória	Bravo <i>et al.</i> , 1994
<i>L. deserta</i>	ID	Ac policlonal de coelho Anti <i>L. deserta</i>	ID, intralesional	Antiveneno até 4 h = inibição total da inflamação e dermonecrose	Gomez <i>et al.</i> , 1999
<i>L. gaucho</i>	ID	Ac monoclonal de Coelho Anti <i>L. gaucho</i>	IV	Antiveneno até 6 h = inibição de 97% da área dermonecrótica	Guilherme <i>et al.</i> , 2001
<i>L. gaucho</i>	ID	Ac policlonal equino Anti <i>L. gaucho</i>	IV	Antiveneno até 12 h = inibição de 76% da área dermonecrótica	Guilherme <i>et al.</i> , 2001
<i>L. Boneti</i>	ID	Ac policlonal eqüino Anti <i>L. boneti</i>	IV	Antiveneno 1h a 2h30 = inibição de 72 e 67% da dermonecrose	De Roodt <i>et al.</i> , 2007

FONTE: ADAPTADO DE PAULI *et al.* (2006)

NOTA: \* estudos posteriores demonstraram tratar-se da mesma espécie; ID= Intradérmica; IV= Intravenosa; Adm= Via de Administração; Ac= Anticorpo

BARBARO *et al.*, 2005, relatam em estudo realizado em coelhos, através de incubação prévia do veneno com o antiveneno e inoculação desta mistura no dorso dos animais, que os dois antivenenos comerciais brasileiros foram capazes de neutralizar as reações locais e dermonecróticas induzidas pelos venenos das aranhas de interesse médico nas Américas, *L. deserta*, *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. reclusa*. Quando os dois antivenenos brasileiros foram comparados por ensaio imunoenzimático - ELISA, foi observado título significativamente menor do soro antiaracnídico em relação ao soro antiloxoscélico poliespecífico frente ao veneno de *L. laeta* (Tabela 4).

Em estudo realizado por DE ROODT *et al.* (2007) com antivenenos (anti *L. boneti*, anti *L. reclusa*, anti *L. gaucho* e anti *L. laeta*) foi observado reatividade cruzada por ELISA com os venenos das quatro espécies avaliadas, sendo esta reatividade mais pronunciada para *L. boneti* e *L. reclusa*. Entretanto, quando a atividade das fosfolipases-D dos venenos foram testadas por imunodifusão dupla, somente o soro anti *L. laeta* foi capaz de bem reconhecer a fosfolipase desta espécie, sendo fracamente reconhecida pelo soro anti *L. gaucho*. Os achados de BARBARO *et al.* (2005) e DE ROODT *et al.* (2007), vêm de encontro ao estudo de GUILHERME *et al.* (2001), que enfatizam diferenças na composição e toxicidade dos venenos loxoscélicos.

DE OLIVEIRA *et al.* (2005), também observaram diferenças na expressão de proteínas, glicoproteínas e atividade da Fosfolipases entre os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* e estas diferenças foram refletidas na toxicidade dos venenos, incluindo a capacidade para induzir hemólise dependente de complemento, dermonecrose e letalidade, sugerindo que para acidentes envolvendo a aranha marrom *L. laeta* é necessária terapia com soro específico.

TABELA 4 – REAÇÃO ANTIGÊNICA CRUZADA ENTRE VENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Loxosceles* sp DETERMINADA POR ELISA USANDO ANTIVENENO COMERCIAL BRASILEIRO

Antiveneno	Veneno				
	<i>L. deserta</i> (ELISA Título)	<i>L. gaucho</i> (ELISA Título)	<i>L. intermedia</i> (ELISA Título)	<i>L. laeta</i> (ELISA Título)	<i>L. reclusa</i> (ELISA Título)
<b>Soro Antiaracnídico</b> anti <i>L. gaucho</i> F(ab') <sub>2</sub> *	128.000	256.000	128.000	64.000	128.000
<b>Soro Antiloxoscélico</b> Anti <i>L. laeta</i> , <i>L. intermedia</i> e <i>L. gaucho</i> F(ab') <sub>2</sub> **	256.000	512.000	512.000	512.000	512.000

FONTE: ADAPTADO DE BARBARO *et al.*, 2005

NOTA: \* Lote 0211124, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

\*\* Lote S01/00, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná, Brasil



Objetivando determinar o tempo limite para recuperação do veneno de *L. reclusa* inoculado por via intradérmica em coelhos, KRYWKO e GOMEZ (2002) verificaram a presença de veneno em pêlo, aspirado e biópsia de tecido por um período de 7 dias, no entanto quando pesquisado na circulação sanguínea este foi indetectável em 24 horas pelo método de imunoensaio enzimático.

GUBERT (2005) utilizando coelhos experimentalmente inoculados por via subcutânea demonstrou a presença do veneno circulante de *L. intermedia* nos soros dos animais até quatro horas após a inoculação do veneno. A eliminação rápida do veneno circulante em modelo animal leva alguns autores a questionarem o uso e a eficácia do antiveneno. No entanto, LEÓN *et al.*, 1997, citam que é possível que o mecanismo mais importante para neutralizar toxinas ativas do veneno de serpente *Bothrops asper* esteja baseado na ligação de anticorpos a toxinas da circulação, com a conseqüente redistribuição de componentes do veneno do tecido para o compartimento vascular.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.* (1998), em estudo realizado com 112 pacientes atendidos na Unidade de Saúde Boa Vista, Curitiba, Brasil, demonstraram por imunoensaio enzimático a presença de veneno circulante no soro de 30 pacientes atendidos até 24 horas após acidente com *L. intermedia*. A presença do veneno e o seu tempo de permanência na circulação são fatores determinantes para a confirmação do diagnóstico e definição do tratamento. No entanto, ainda não existem kits comerciais disponíveis para diagnóstico do loxoscelismo.

As lesões cutâneas provocadas pelo veneno da aranha *Loxosceles* em modelo animal foram determinadas a partir dos estudos de PIZZI *et al.* (1957) e FURLANETTO (1961), encontrando-se bem estabelecidas na literatura. O envenenamento sistêmico em modelo experimental é discutido nos trabalhos de DA SILVA *et al.* (2003) e TAVARES *et al.* (2004), onde coelhos foram submetidos ao veneno da aranha marrom e alterações hematológicas, bioquímicas e hemostáticas são descritas. O estudo de DA SILVA *et al.* (2003), demonstrou alterações celulares que ocorreram na medula óssea e sangue periférico dos coelhos após exposição com veneno de *L. intermedia*. Amostras de medula óssea e sangue periférico foram colhidos antes do envenenamento, e em períodos que variaram de 4 horas a 30 dias após inoculação do veneno. Os resultados obtidos demonstraram que a série vermelha não foi afetada pelo veneno, somente os eritroblastos apresentaram decréscimo. A depleção medular de megacariócitos teve uma boa correlação com a

trombocitopenia no sangue periférico, a qual se correlacionou com os achados histopatológicos, obtidos a partir de biópsias da pele dos coelhos. A celularidade dos neutrófilos medulares correlacionou-se significativamente com as alterações neutrofílicas periféricas.

TAVARES *et al.* (2004), utilizando veneno de *L. gaucha* avaliaram também em coelhos nos tempos 3, 24, 48, 72 e 120 horas após o envenenamento, a contagem de células no sangue periférico, através do hemograma, a função plaquetária, a coagulação sanguínea e parâmetros bioquímicos. Observou-se trombocitopenia e leucopenia inicial, seguida de aumento destas células, agregação plaquetária, níveis de haptoglobina e fibrinogênio elevados, alterações na série vermelha e significativa diminuição do fator VII da coagulação. Não se observou hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada, nem alteração da função renal, tendo uréia e creatinina permanecido normal, já as transaminases mostraram-se aumentadas. A análise histopatológica da pele foi realizada 24 horas após a administração do veneno e mostrou presença maciça de leucócitos e plaquetas, hemorragia e formação de trombos no local de injeção do veneno, validando as alterações hematológicas observadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados coelhos albinos, raça Nova Zelândia, com peso entre 2.500 g e 3.300 g, machos, hígidos, proveniente de criadouro qualificado com controle sanitário e zootécnico. Os animais permaneceram em quarentena no criadouro em gaiolas individuais por no mínimo 14 dias. Foram recebidos no laboratório de experimentação animal do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, Piraquara, Paraná, Brasil, continuando em quarentena por mais 10 a 14 dias para adaptação antes do início dos testes. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 18°C e 22°C e com fornecimento de água e alimentação *ad libitum*. Estes foram avaliados no momento do recebimento, durante a quarentena e o experimento por médico veterinário do CPPI. Foram excluídos os animais que apresentaram perda de peso durante a quarentena, problemas constatados na avaliação clínica e valores anormais (QUESENBERRY, 1994) no tempo pré-envenenamento para os ensaios laboratoriais a serem avaliados no trabalho.

### 4.2 VENENO

O veneno utilizado foi do lote 52/04-CPPI, proveniente de aranhas do gênero *Loxosceles*, capturadas na natureza em Curitiba e região metropolitana e identificadas taxonomicamente como *L. intermedia* (GERSTSCH W.J., 1967 e FISCHER M.C., 1994), sendo mantidas por 30 dias sem nenhum tipo de alimento antes da extração, excetuando-se água. O veneno foi obtido através de um estímulo elétrico de 15 volts aplicado ao cefalotórax das aranhas, a fim de evitar contaminação com enzimas digestivas. A mistura de veneno de 3.401 espécimes foi dessecada a vácuo e conservada a 20°C  $\pm$  2 negativos. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976) e a atividade tóxica por Furlanetto (1961).

### 4.3 ATIVIDADE DERMONECRÓTICA DO VENENO

Optou-se para padronização da quantidade de veneno a ser inoculada, pela atividade biológica estabelecida como dose mínima necrosante (DMN), visto que venenos com o mesmo conteúdo protéico apresentam toxicidades totalmente diferentes e venenos com a mesma toxicidade apresentam concentrações protéicas distintas (EL HAFNY *et. al*, 2002) e conforme recomendado por THEAKSTON *et al.*, 2003. A DMN foi realizada pela metodologia estabelecida por FURLANETTO (1961), sendo 1 DMN a menor quantidade de veneno capaz de provocar na orelha do coelho uma área necrótica de 1 cm de diâmetro, o valor obtido serviu para padronizar a quantidade de veneno a ser utilizado na determinação da cinética de envenenamento e avaliação do efeito da soroterapia. Visando reproduzir o acidente loxoscélico, o veneno foi inoculado no dorso dos animais por via intradérmica. Os procedimentos com animais envolvendo experimentos de dermonecrose foram realizados de acordo com as leis federais do Brasil e foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná com o certificado N° 126.

### 4.4 SORO ANTILOXOSCÉLICO

O soro antiloxoscélico utilizado foi produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - CPPI e trata-se de uma solução purificada contendo frações  $F(ab')_2$  de imunoglobulinas de origem eqüina, específicas para a neutralização dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA sob n° 1.1731.0001.001-3. Foi obtido a partir de plasma hiperimune de eqüídeos hígidos, imunizados com mistura de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. A mistura de plasma obtido foi submetida à precipitação protéica por sulfato de amônio (HEBERT, 1973), digestão enzimática pela pepsina e termo desnaturação, conforme trabalhos de POPE (1939) e HARM (1948), seguindo para diálise, posterior cromatografia de troca iônica e concentração final do volume por sistema Pellicon®. Foi utilizado o lote S01/06 fabricado em dezembro de 2006 e com validade até dezembro de 2009, este apresentou potência neutralizante de 18 DMN/mL, isto é quando administrado em coelhos concomitantemente ao veneno, 1 mL de soro é capaz de neutralizar 18

DMN. A potência mínima aceitável para os soros antiloxoscélicos no Brasil é de 15 DMN segundo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA, segunda edição, parte IV, fascículo VI de 2005. A alta potência neutralizante requerida para os soros antivenenos deve-se ao fato destes soros serem administrados ao paciente após a fase de distribuição do veneno, quando as propriedades tóxicas já se difundiram (EL HAFNY *et al.*, 2002).

#### 4.5 PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE VENENO E SORO ANTILOXOSCÉLICO

A quantidade de veneno de *L. intermedia* foi estabelecida através de estudo piloto com grupos de cinco animais testados com uma, duas e três doses mínimas necrosantes. O grupo inoculado com 01 dose necrosante apresentou exuberante processo inflamatório, porém lesão necrótica, expressa em crosta necrótica, em apenas 80% dos animais. Tendo em vista que a presença de necrose no grupo controle é imprescindível para avaliar a ação do soro, esta quantidade foi descartada. A quantidade de veneno escolhida foi de duas DMN o que equivale a 16 µg de veneno bruto de *L. intermedia* (15 µg de proteína), o suficiente para provocar lesão dermonecrotica, culminando em crosta necrótica em 100% dos animais e alterações sistêmicas de acordo com a literatura (DA SILVA *et al.*, 2003 e TAVARES *et al.*, 2004). O grupo inoculado com 03 DMN não demonstrou alteração significativa em relação aos parâmetros sistêmicos quando comparado com o grupo de 02 DMN.

A quantidade de soro antiloxoscélico foi arbitrada com base no tratamento do envenenamento loxoscélico em humanos, que têm como objetivo a neutralização da maior quantidade possível de veneno inoculado pela aranha independente do peso do paciente, sendo recomendada a mesma dose para crianças e adultos. A dose de soro utilizada foi o equivalente a metade da dose recomendada para o acidente humano de gravidade moderada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2001). Isto é, considerando a quantidade estimada de veneno inoculado no acidente humano como 50 µg e a dose recomendada para o acidente de gravidade moderada que são 25 mL, a dose de soro seria de 8 mL por coelho se considerado a quantidade de veneno inoculada no coelho que foi 16 µg. No entanto, foi utilizado o equivalente à metade da dose calculada, isto é 4 mL por coelho, tendo em vista tratar-se de soro contendo proteínas heterólogas para os animais testados, injetado por via

intravenosa de forma rápida e sem diluição, enquanto em humanos a recomendação é para aplicação lenta e com soro diluído. No entanto, não foi observado qualquer tipo de reação adversa nos coelhos que receberam o soro antiloxoscélico.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE AVALIAÇÃO APÓS ENVENENAMENTO

Os tempos de avaliação foram os mesmos para a avaliação cutânea e sistêmica, definidos como: pré-envenenamento (24 a 48 horas antes do ensaio e expresso nos resultados como tempo zero hora), 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após a inoculação do veneno. Estes tempos foram escolhidos baseados em dados da literatura e mais especificamente nos trabalhos de OSPEDAL *et al.* (2002), DA SILVA *et al.* (2003) e TAVARES *et al.* (2004) e após a realização de ensaios piloto onde se verificou a viabilidade de coletas de sangue seriadas no mesmo coelho, de modo a obter-se a evolução cinética do envenenamento. Adicionaram-se os tempos intermediários 96 horas e 192 horas na avaliação dos parâmetros cutâneos a fim de assegurar o momento em que a dermonecrose apresentou-se na sua maior extensão.

#### 4.7 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi planejado de modo a reproduzir o acidente loxoscélico, sendo cada animal inoculado com veneno e acompanhado por 10 dias para avaliação da cinética do envenenamento. Foram utilizadas doses independentes de veneno e soro antiloxoscélico, a soroterapia foi ministrada em diferentes intervalos de tempo, sendo estabelecidos 8 grupos de animais, com no mínimo 12 e no máximo 15 coelhos por grupo, tendo sido utilizado o seguinte protocolo:

No grupo controle normal foi administrado 200 µl de solução salina por via intradérmica no dorso; no grupo controle veneno foi inoculado 2 DMN de veneno de *Loxosceles intermedia* diluído em 200 µl de solução salina por via intradérmica no dorso; no grupo controle soro, os animais receberam 4 mL de soro antiloxoscélico por via intravenosa na veia marginal da orelha; no grupo soroterapia 6 h, os animais receberam soro antiloxoscélico (4 mL por via intravenosa) 6 h após a inoculação de veneno (2 DMN via intradérmica no dorso); nos demais grupos soroterapia 12 h; 24 h; 36 h e 48 h após o envenenamento, a quantidade de veneno e soro foi a mesma

para todos os grupos, o que variou foi o tempo de administração do soro nestes respectivos tempos após o envenenamento.

## 4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS A SEREM AVALIADOS

### 4.8.1 Parâmetros Cutâneos

A determinação dos parâmetros cutâneos baseou-se na literatura disponível a partir dos estudos de PIZZI *et.al.* (1957) e FURLANETTO (1961), onde a típica lesão causada pelo veneno loxoscélico é iniciada por edema e eritema no local da picada, seguido por extensão da lesão através de espalhamento gravitacional acompanhado por equimose e necrose dérmica. Os parâmetros edema, eritema, equimose e necrose foram escolhidos para avaliar a evolução do envenenamento e a ação do soro antiloxoscélico em diferentes tempos após o envenenamento. O edema presente no dorso dos coelhos foi medido através de paquímetro (Digimess) sendo efetuadas as medidas de comprimento e largura na sua extensão média, para cálculo da área quadrática (cm<sup>2</sup>). A intensidade do eritema foi avaliada com base na sua extensão e coloração através de padrão definido em escala de intensidade como unidades arbitrárias de 0 a 4 (com valores intermediários de 0,5).

A equimose de coloração lilás suave a fortemente violácea foi medida da mesma forma que o edema e expressa em área quadrática. A área necrótica foi medida no momento em que a lesão se tornou crosta necrótica e no seu maior tamanho, independente do tempo de avaliação. Devido à irregularidade no formato das lesões necróticas, a medida foi efetuada através da reprodução do desenho da lesão sendo, colocado sobre o dorso do animal um filme plástico, e então, transferida exatamente seu formato sem deformação para papel milimetrado. A área resultante foi finalmente calculada em cm<sup>2</sup>. Nos casos de mais de uma região necrosada no mesmo animal, estas foram medidas individualmente e somadas.

### 4.8.2 Parâmetros Sistêmicos

A determinação dos parâmetros sistêmicos baseou-se nos trabalhos de DA SILVA *et al.* (2003) e TAVARES *et al.* (2004), onde alterações hematológicas, hemostáticas e bioquímicas foram observadas em diferentes tempos em coelhos

inoculados experimentalmente com veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho*. A avaliação sistêmica foi realizada concomitantemente nos coelhos utilizados para avaliação cutânea. Para avaliar a evolução do envenenamento e a ação do soro antiloxoscélico, foram utilizados os ensaios de função renal (uréia e creatinina); função hepática (ALT - amino alanina transaminase e AST - amino aspartato transaminase); alteração da hemostasia através da dosagem de fibrinogênio, contagem de plaquetas e grau de hemólise e/ou hemorragia (contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito); e contagem de leucócitos totais e neutrófilos para avaliar a resposta inflamatória.

As amostras de sangue para avaliação sistêmica foram coletadas nos tempos definidos como: pré-envenenamento, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após a inoculação do veneno. O material para análise foi coletado da veia central da orelha do coelho. O volume coletado em cada punção foi de 4 mL, sendo imediatamente transferido 1 mL de sangue a micro tubo com K3EDTA para hemograma, 1 mL a micro tubo com citrato de sódio 3,2% para dosagem de fibrinogênio e 2 mL a tubo seco com ativador de fibrina para dosagens bioquímicas. Os tubos prontos para uso foram da marca Greiner Bio-one, sistema Minicollect® (Monroe, E.U.A.)

Os ensaios foram realizados em duplicata e utilizou-se a média das determinações. Os ensaios de bioquímica e coagulação foram executados no Laboratório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, enquanto que o hemograma foi realizado no Laboratório de Hematologia do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Paraná, Brasil. O hemograma e as dosagens bioquímicas foram realizados por sistema automatizado ADVIA Bayer/Siemens Diagnostics, sendo a contagem diferencial conferida por microscopia ótica. A uréia foi testada pelo método de urease UV, a creatinina por Jaffé, ALT e AST pelo método cinético UV (IFCC). As dosagens de fibrinogênio pelo método de coagulometria ótica em sistema automatizado CA1500 Sysmex. Em ambos os laboratórios, o coeficiente de variação dos ensaios foi acompanhado para aceite do controle dos aparelhos utilizados (HENRY, 2001).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada neste trabalho para a avaliação dos parâmetros sistêmicos a



análise de variância – ANOVA de experimentos fatoriais (MONTGOMERY, 2000), sendo: o primeiro fator com dois níveis (um grupo controle e um grupo teste) e o segundo fator com 7 níveis (tempo zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 h). Sendo os grupos comparados (coelhos normais X envenenados; coelhos envenenados X tratados com soro antiloxoscélico e coelhos normais X coelhos que só receberam soro).

A avaliação dos parâmetros cutâneos, a fim de verificar o efeito do eritema, edema e equimose nos grupos e nos tempos de avaliação, utilizou a análise de variância por delineamento completamente casualizado e pós-teste de Tukey nos diferentes intervalos de tempo (MONTGOMERY, 2000). A homocedasticidade, normalidade e independência dos dados foram verificadas para atendimento as premissas da ANOVA. A área necrótica foi avaliada através do teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, de modo a avaliar a diferença entre os grupos que receberam soroterapia e o controle veneno (SIEGEL e JOHN CASTELAN 2006).

Foi utilizado o software R: A language and environment for statistical computing (2006) e foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas com  $p < 0,05$ . Em face da característica estatística do estudo o número amostral foi recomendado em no mínimo 11 animais. Tendo em vista que o número de coelhos variou de 12 a 15 nos grupos testados o programa estatístico utilizado escolheu de forma completamente aleatória 12 animais por grupo para efetuar a ANOVA dos parâmetros sistêmicos e cutâneos. A avaliação da dermonecrose por se tratar de teste não paramétrico foi realizada com o número de animais utilizados em cada grupo.

Os resultados foram avaliados pela ANOVA, em relação à avaliação sistêmica, de dois pontos de vista de modo a informar se houve diferença entre os tratamentos:

1. No conjunto: os dados obtidos em todos os tempos para cada parâmetro laboratorial avaliado são considerados como um perfil único de evolução na cinética do envenenamento. Do mesmo modo, os grupos que receberam soro são comparados com o controle que só recebeu veneno, assim, a soroterapia ministrada em diferentes momentos após o envenenamento é confrontada quanto a sua interferência no conjunto do processo, conferindo um p-valor.

2. No decorrer do tempo: a partir da interpretação do “conjunto” com os dados obtidos em cada tempo isoladamente (zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas), foram realizadas análises combinatórias através de modelo matemático que permite determinar a ação do soro em cada tempo específico frente ao perfil do conjunto todo. Deste modo, permitindo a observação do impacto do tempo na cinética do envenenamento e tratamento, conferindo um segundo p-valor. Adicionalmente, uma comparação final e pontual entre o grupo tratado e o controle em cada tempo avaliado, permite isoladamente saber exatamente em que tempo específico o soro interferiu na ação do veneno, conferindo o terceiro p-valor. Essa interpretação se aplicou igualmente quando o grupo controle normal foi comparado com o controle veneno e com o grupo inoculado somente com soro antiloxoscélico ( controle soro).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CUTÂNEO DO VENENO DE *L. intermedia* NOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE VENENO

A lesão cutânea no grupo veneno iniciou-se na maioria dos animais testados em 90 minutos após a injeção do veneno de *L. intermedia*, tendo em 3 horas 100% destes apresentando edema, eritema e equimose no local da injeção. A lesão espalhou-se de forma gravitacional sendo acompanhada por necrose dérmica. A lesão cutânea foi avaliada na sua evolução e medida de 12 horas até 10 dias conforme mostra a tabela 5, onde se observa em negrito a maior intensidade do eritema, maior extensão do edema em 24 horas e maior área equimótica em 48 horas. A presença de necrose foi observada a partir de 12 horas em vários animais, porém foi medida a partir da formação da crosta necrótica em seu maior tamanho independente do tempo de avaliação. A cicatrização completa do tecido necrosado ocorreu de 14 a 32 dias, de acordo com a extensão da área necrótica. A figura 1 apresenta a seqüência fotográfica da evolução temporal do envenenamento através de um coelho representativo dos eventos observados no grupo controle veneno. A evolução cinética do envenenamento cutâneo é apresentada e comparada com a ação do soro antiloxoscélico no item 5.4.

O grupo controle normal, inoculado com solução salina, apresentou ausência completa dos parâmetros (edema, eritema, equimose e dermonecrose) avaliados.

TABELA 5 - EVOLUÇÃO DA LESÃO CUTÂNEA NO GRUPO CONTROLE VENENO APÓS INOCULAÇÃO DE 2 DMN DE VENENO DE *L. intermedia*

Parâmetro/	Média							
Tempo	12h	24h	48h	72h	96h	120h	192h	240h
Eritema (UA)	1,9	<b>3,0</b>	2,3	1,2	0,5	0,1	0,0	0,0
Edema (cm <sup>2</sup> )	30,6	<b>34,8</b>	29,9	23,4	16,8	11,8	1,3	0,0
Equimose (cm <sup>2</sup> )	13,9	14,8	<b>16,3</b>	12,6	8,1	1,9	0,0	0,0
Crosta necrótica (cm <sup>2</sup> ) medida no seu maior tamanho independente do tempo de avaliação	<b>5,8</b>							

NOTA: n=15; UA: unidades arbitrárias; valor em **negrito**: pico máximo

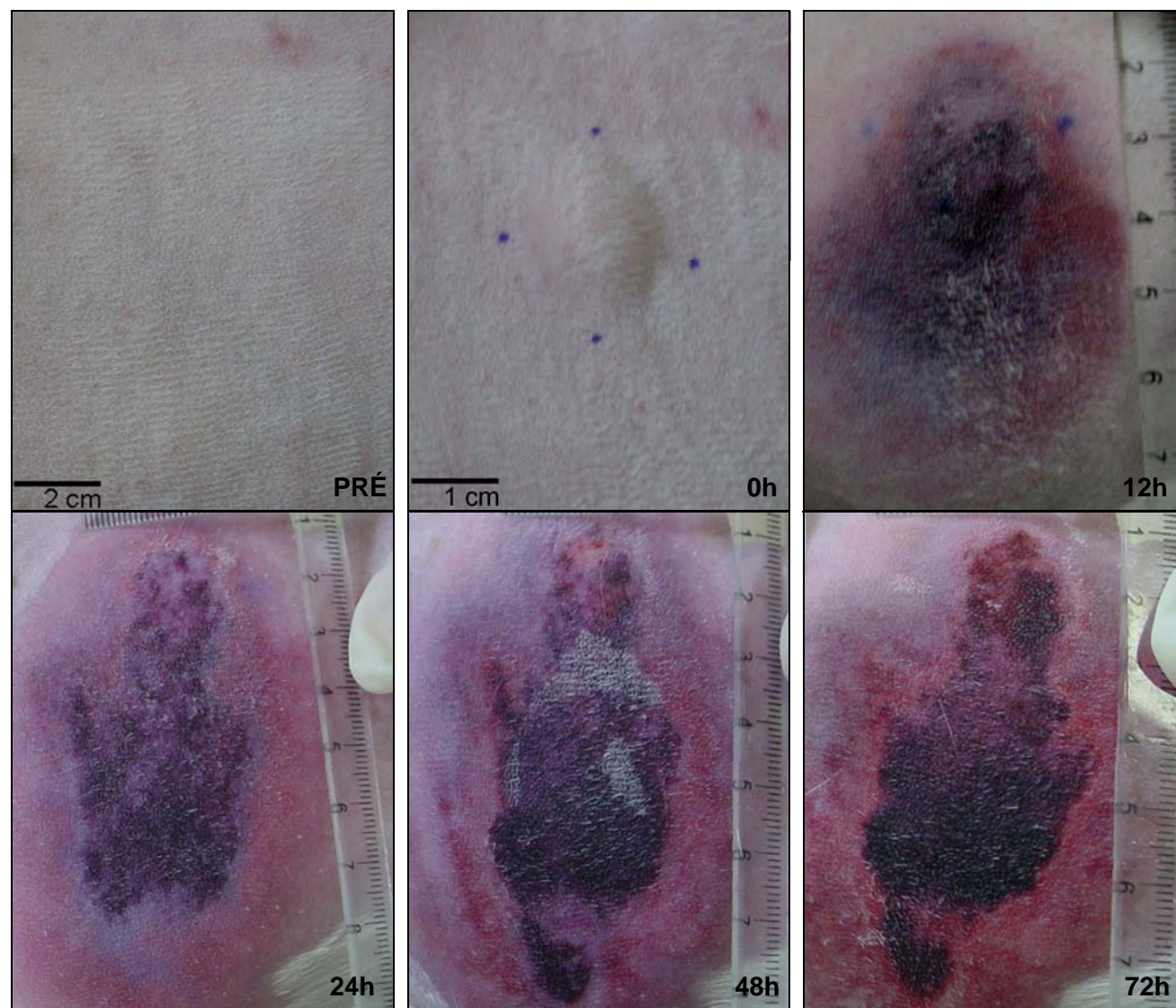


FIGURA 1 CONTINUA – FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DO GRUPO CONTROLE INOCULADO COM VENENO DE *L. intermedia*. FONTE: O AUTOR (2008) NOTA: Os pontos azuis no tempo zero são para indicar a inoculação intradérmica do veneno.

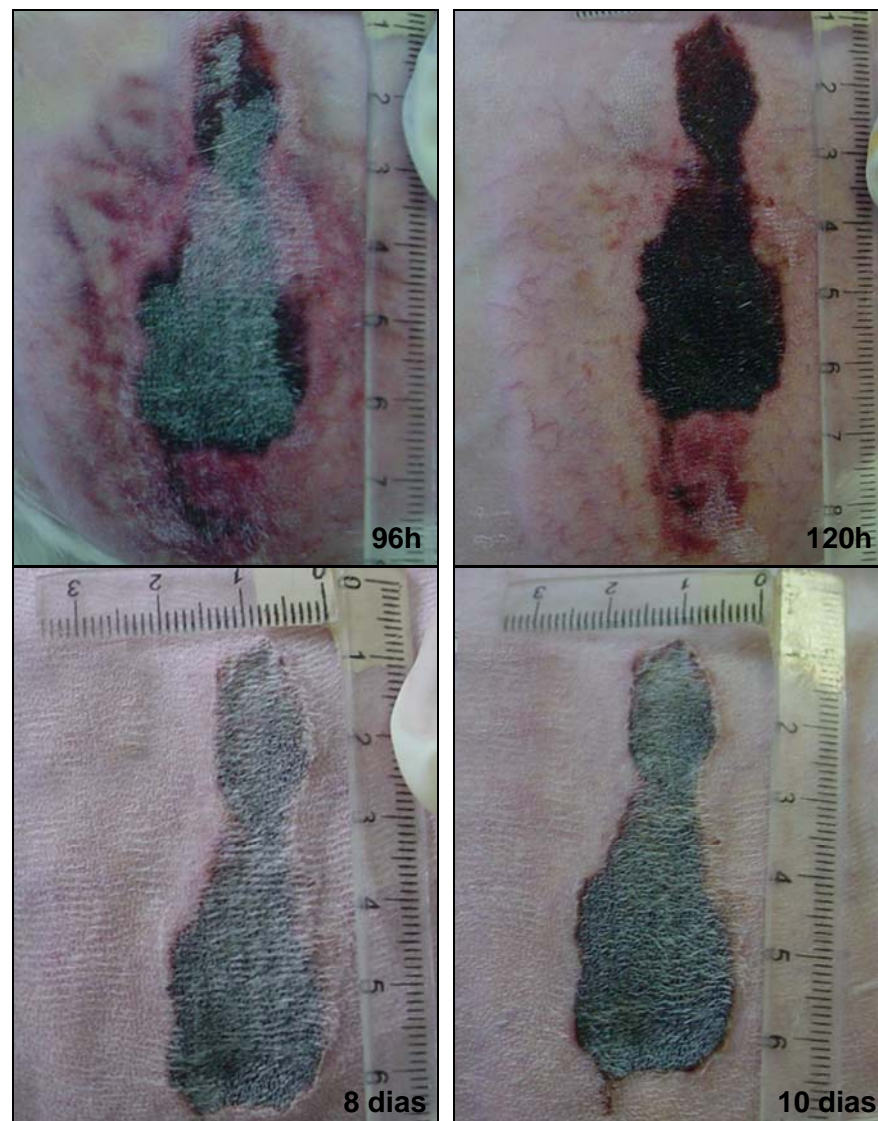


FIGURA 1 CONCLUSÃO – FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DO GRUPO CONTROLE INOCULADO COM VENENO DE *L. intermedia*. FONTE: O AUTOR (2008)

## 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DO VENENO DE *L. intermedia* NOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE VENENO

Os resultados dos parâmetros laboratoriais avaliados nos animais que compuseram o grupo controle normal, grupo este, que serviu para comparação do efeito sistêmico do veneno nos animais envenenados é apresentado na tabela 6. O grupo controle normal foi compatível com os valores de referência para os ensaios realizados (QUESENBERRY, 1994), com exceção da dosagem de uréia que se apresentou acima do valor de referência, porém compatível com resultados observados em estudo brasileiro (EMANUELLI *et al.*, 2007) e ALT que apresentou valor muito próximo ao valor de referência e de acordo com os resultados obtidos por DE BRITO *et al.*, 2004.

TABELA 6 - VALORES DE REFERÊNCIA PARA COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA E VALORES DETERMINADOS NO GRUPO CONTROLE NORMAL

Ensaios	Valores de Referência (Quesenberry, 1994)	Grupo Controle Normal Média ± (EPM)
Dosagem de Fibrinogênio (mg/dL)	NC	198,31 (8,05)
Contagem de Plaquetas (n.10 <sup>3</sup> /μL)	250 a 650	312,97 (17,36)
Contagem de Leucócitos (n.10 <sup>3</sup> /μL)	5,2 a 12,5	8,27 (0,36)
Contagem de Neutrófilos (valor relativo% e valor absoluto n.10 <sup>3</sup> /μL)	20 a 75%	52,36% 4,33.10 <sup>3</sup> /μL (0,22)
Contagem de Eritrócitos (n.10 <sup>6</sup> / μL)	5,1 a 7,9	5,60 (0,14)
Hemoglobina (g/dL)	10,0 a 17,4	12,08 (0,24)
Hematócito (%)	33 a 50	36,23 (0,71)
Dosagem de Uréia (mg/dL)	13 a 29	39,05 (1,99)*
Dosagem de Creatinina (mg/dL)	0,5 a 2,5	0,92 (0,05)
Dosagem de ALT (U/L)	48 a 80	42,75 (2,88)**
Dosagem de AST (U/L)	14 a 113	29,54 (2,96)

NOTA: Valores apresentados como a média de todos os animais nos tempos avaliados ± erro padrão da média (EPM).

NC= não consta; ALT= amino alanina transaminase; AST= amino aspartato transaminase

\* valor compatível com EMANUELLI *et al.* (2007); \*\* valor compatível com DE BRITO *et al.* (2004)

Os animais expostos ao veneno de *L. intermedia* apresentaram alterações sistêmicas significativas: na dosagem de fibrinogênio com aumento dos níveis

séricos já a partir de 12 horas da inoculação do veneno, acompanhado de acentuada queda na contagem de plaquetas conforme mostra a figura 2. Na celularidade do sangue periférico expressa na contagem de leucócitos e neutrófilos com diminuição destas células nas primeiras 24 horas, seguido de leucocitose neutrofílica, figura 3. E decréscimo na contagem de eritrócitos e nos índices hematimétricos, hemoglobina e hematócrito, a partir de 48 horas após o envenenamento, figura 4.

Em relação aos parâmetros sistêmicos como uréia, creatinina, ALT e AST não se observaram diferenças significativas quando comparados com o controle normal. A evolução cinética do efeito do envenenamento sistêmico é apresentada e comparada com a ação do soro antiloxoscélico no item 5.5.

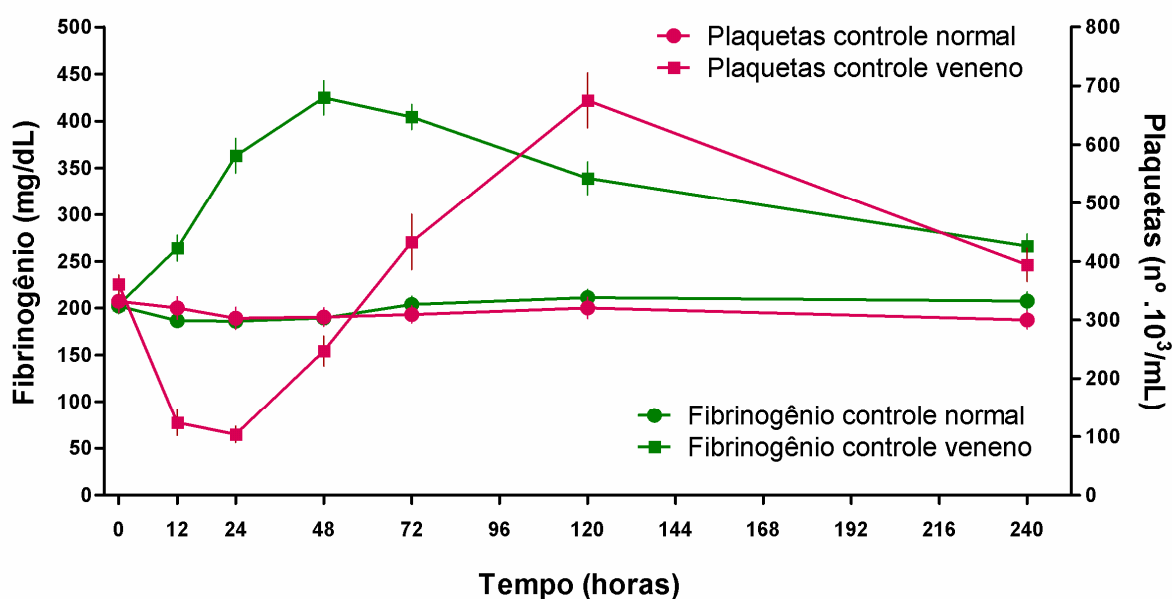


FIGURA 2 - DOSAGEM DE FIBRINOGENO E CONTAGEM DE PLAQUETAS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E CONTROLE NORMAL

Dosagem de fibrinogênio e contagem de plaquetas média ( $n=12$ )  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* diluída em 200  $\mu$ L de salina ID no dorso) e grupo controle normal (200  $\mu$ L de salina ID no dorso). No grupo controle veneno o fibrinogênio mostrou-se significativamente aumentado tanto no conjunto como no decorrer do tempo, ANOVA  $p < 0,000001$ ; a contagem de plaquetas mostrou diferença significativa no conjunto  $p < 0,005$  e no decorrer do tempo  $p < 0,000001$ . ID= intradérmica.



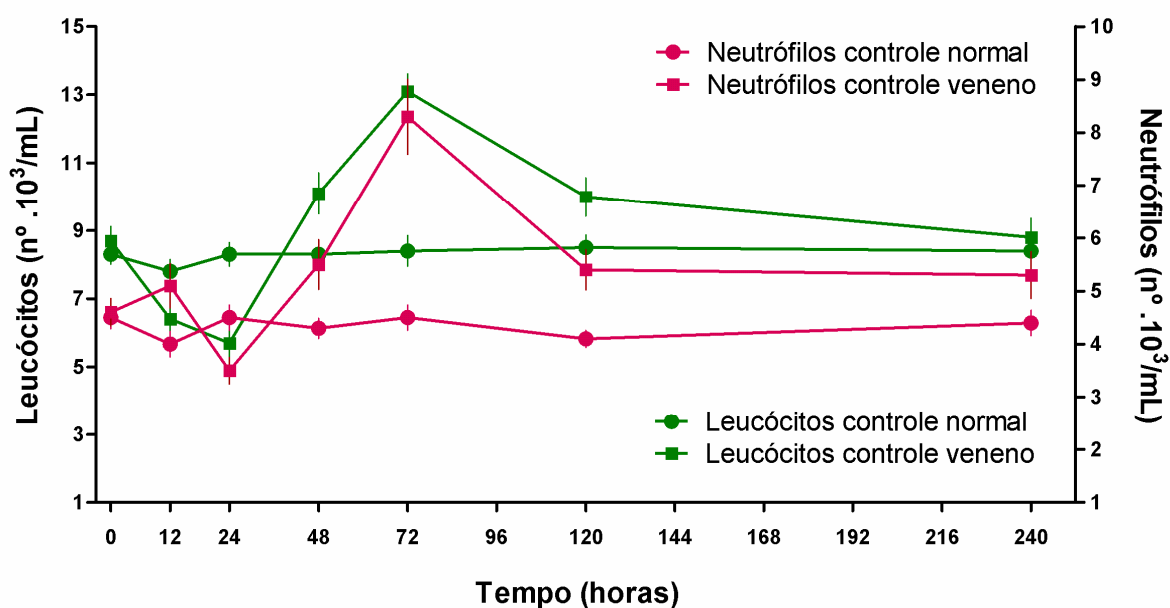


FIGURA 3 - CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E CONTROLE NORMAL

Contagem de leucócitos e neutrófilos média ( $n=12$ )  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* diluída em 200  $\mu$ L de salina ID no dorso) e grupo controle normal (200  $\mu$ L de salina ID no dorso). No grupo controle veneno a contagem de leucócitos e neutrófilos mostraram diferença significativa tanto no conjunto como no decorrer do tempo, ANOVA  $p < 0,000005$ . ID= intradérmica.



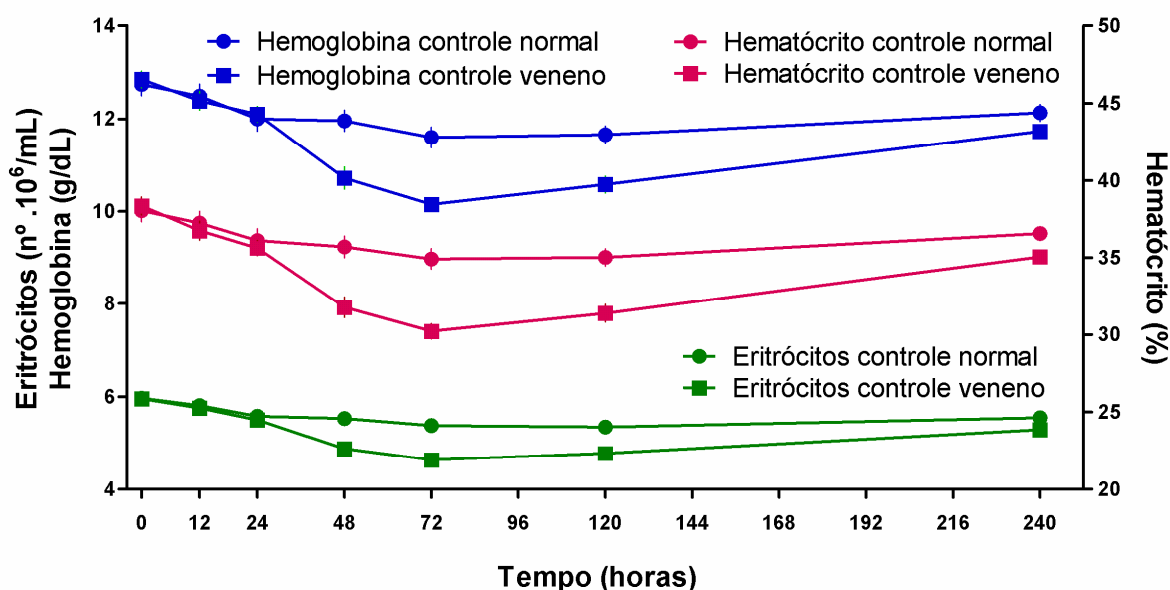


FIGURA 4 - CONTAGEM DE ERITRÓCITOS, HEMOGLOBINA E HEMATÓCRITO NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E CONTROLE NORMAL

Contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e determinação de hematócrito média ( $n = 12 \pm \text{EPM}$ ) medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* diluída em 200  $\mu\text{L}$  de salina ID no dorso) e grupo controle normal (200  $\mu\text{L}$  de salina ID no dorso). No grupo controle veneno a contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito mostraram-se significativamente reduzidos tanto no conjunto, ANOVA  $p < 0,00005$  como no decorrer do tempo  $p < 0,0005$ . ID= intradérmica.

### 5.3 AVALIAÇÃO CUTÂNEA DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO NO DESENVOLVIMENTO DA DERMONECROSE: ERITEMA, EDEMA, EQUIMOSE E ÁREA NECRÓTICA

#### 5.3.1 Eritema

A intensidade do eritema observada variou nos animais testados de 0,5 a 3,5 unidades arbitrárias, atingindo o seu pico máximo em 24 horas em todos os grupos avaliados, o eritema apresentou-se praticamente zerado em 120 horas no grupo controle veneno. Nos animais que receberam soroterapia 6 h e 12 h após envenenamento, observou-se marcante redução do eritema, chegando a quase zero, 72 horas após a inoculação do veneno, conforme mostram a figura 5 e tabela 7. A soroterapia em 6 h mostrou-se significativa após 18 horas ( $p = 0,00001$ ) da sua administração, perfazendo um período de 24 horas após o envenenamento, quando comparado com o controle dos animais apenas envenenados. A soroterapia em 12h

também se mostrou significativa a partir de 36 horas após administração do soro ( $p < 0,05$ ), logo a partir de 48 horas após o veneno. Nos grupos tratados com soro 24, 36 e 48 h após o envenenamento, não se observou significativa diminuição do eritema quando comparados com o controle veneno.

TABELA 7 - VALORES MÉDIOS DE ERITEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Eritema (unidades arbitradas)							
		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	192 h	240 h
Controle Veneno		1,9	3,0	2,3	1,2	0,5	0,1	0,0	0,0
Soroterapia 6 h		1,5	1,7	1,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 12 h		1,8	2,4	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 24 h		2,0	2,9	2,0	0,9	0,1	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 36 h		2,0	2,6	2,2	1,0	0,4	0,1	0,0	0,0
Soroterapia 48 h		2,2	2,8	2,3	1,3	0,8	0,4	0,0	0,0

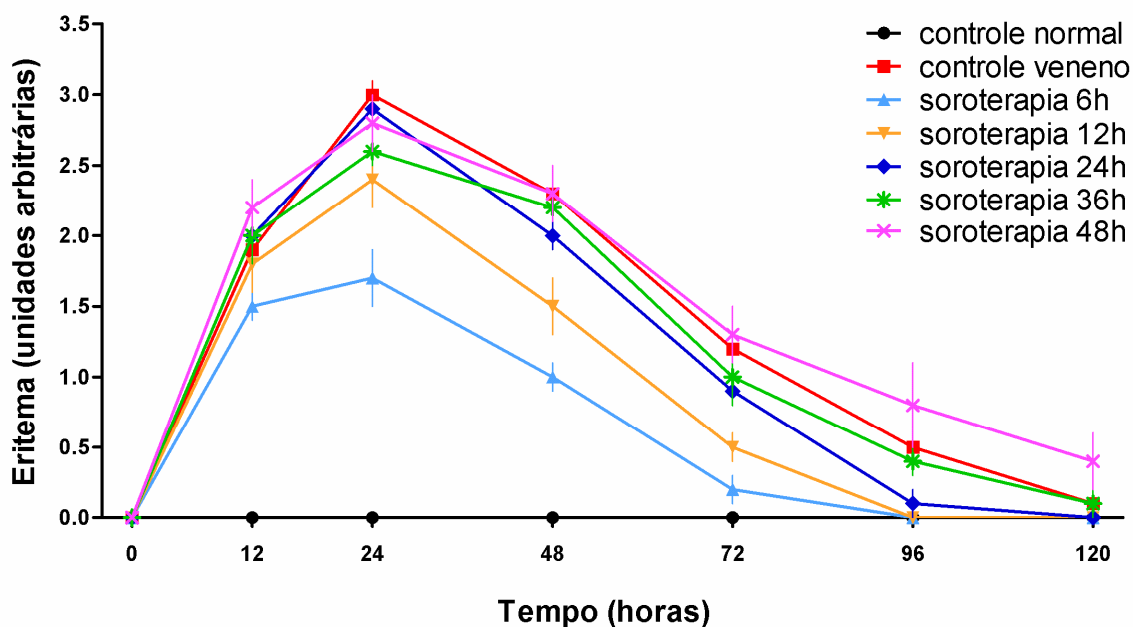


FIGURA 5 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DO ERITEMA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Intensidade do eritema expresso em média ( $n = 12$ )  $\pm$  EPM avaliado nos tempos 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. Os grupos

soroterapia 6 e 12 h reduziram o edema significativamente, ANOVA  $p= 0,00001$  e  $p< 0,05$  respectivamente. ID= intradérmica, IV= intravenoso

### 5.3.2 Edema

A tabela 8 e figura 6 resumem o efeito do soro antiloxoscélico sobre o edema nos grupos que receberam soroterapia nos diferentes tempos, podendo-se observar diferença estatística entre a área do edema nos grupos que foram tratados com soro mais precocemente, isto é, em 6 h e 12 h após o envenenamento. No primeiro grupo a redução do edema mostrou-se significativa a partir de 24 horas após a inoculação do veneno ou 18 horas após a soroterapia ( $p= 0,00001$ ) e no segundo a partir de 48 horas após o veneno ou 36 horas após a soroterapia ( $p< 0,05$ ), respectivamente. O edema atingiu o seu pico máximo em 24 horas após envenenamento em todos os grupos tratados, com exceção dos animais que receberam soroterapia em 6 h, onde o edema apresentou-se do mesmo tamanho observado no tempo 12 horas. Nos animais que só receberam veneno, o edema foi observado em todo o grupo até 120 horas após o envenenamento e em alguns animais até 192 horas. Os grupos que receberam soro antiloxoscélico 24 h, 36 h e 48 h após o veneno não apresentaram diferença quando comparados com o controle.

TABELA 8 - VALORES MÉDIOS DO EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Edema (cm²)							
		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	192 h	240 h
Controle Veneno		30,6	34,8	29,9	23,4	16,5	11,7	1,8	0,0
Soroterapia 6 h		28,2	27,8	18,1	7,1	0,5	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 12 h		28,0	28,6	20,2	12,5	2,3	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 24 h		27,9	32,8	29,2	21,6	15,0	2,1	0,0	0,0
Soroterapia 36 h		28,2	31,8	27,3	20,8	13,2	7,0	0,0	0,0
Soroterapia 48 h		30,4	34,8	31,1	23,8	18,8	11,9	0,0	0,0

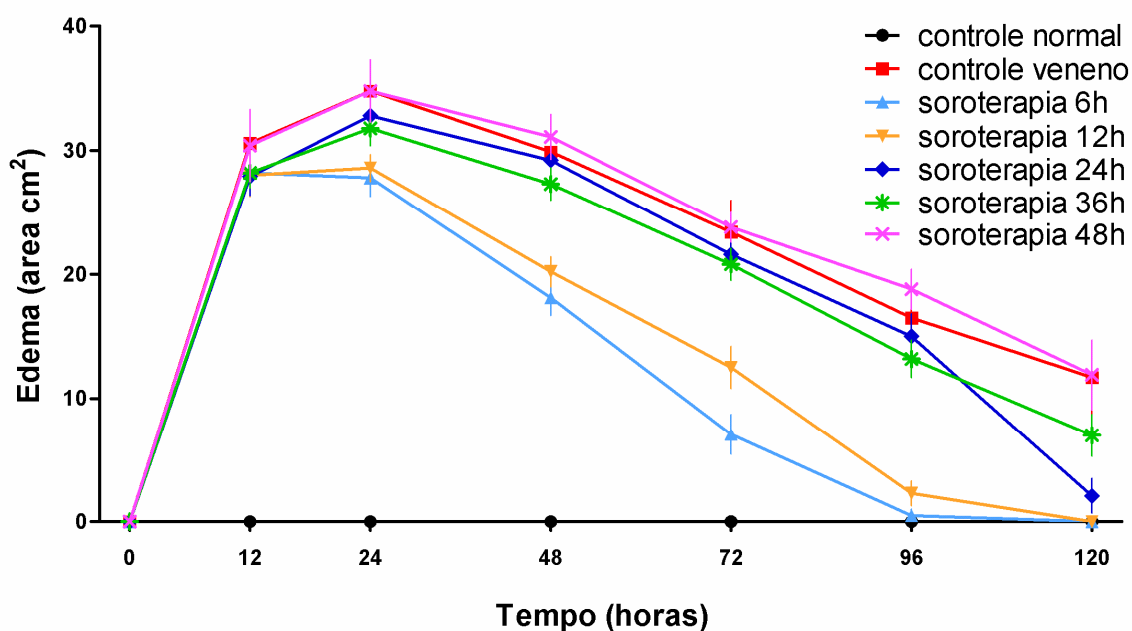


FIGURA 6 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DO EDEMA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Área de edema média ( $n=12$ )  $\pm$  EPM medido nos tempos 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. Os grupos soroterapia 6 e 12 h reduziram o edema significativamente, ANOVA  $p=0,00001$  e  $p<0,05$  respectivamente. ID= intradérmica, IV= intravenoso

### 5.3.3 Equimose

Em relação à equimose, somente o grupo que recebeu soroterapia em 6 h após o veneno apresentou diminuição significativa da área equimótica, isto ocorrendo a partir de 12 horas da inoculação do veneno ou 6 horas após a administração do soro ( $p<0,05$ ). No grupo soroterapia 12 h apesar da redução do tamanho da equimose, conforme mostra a tabela 9 e figura 7, esta não foi significativa estatisticamente ( $p=0,052$ ). Com exceção dos grupos tratados com soro em 6 h e 12 h, todos os grupos avaliados expressaram o seu pico máximo de equimose em 48 horas, inclusive o controle veneno. Os grupos de soroterapia 24 h, 36 h e 48 h não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

TABELA 9 - VALORES MÉDIOS DA EQUIMOSE OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos/ Tempos	Equimose – Médias (cm <sup>2</sup> )							
	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	192 h	240 h
Controle Veneno	13,9	14,8	16,3	12,6	8,1	1,9	0,0	0,0
Soroterapia 6 h	5,9	7,7	6,7	2,8	0,3	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 12 h	12,7	12,4	11,4	7,0	2,5	0,0	0,0	0,0
Soroterapia 24 h	13,4	15,7	17,8	15,1	5,2	0,6	0,0	0,0
Soroterapia 36 h	12,7	15,8	16,7	15,4	9,4	1,2	0,0	0,0
Soroterapia 48 h	15,5	16,9	17,7	14,1	6,0	0,6	0,0	0,0

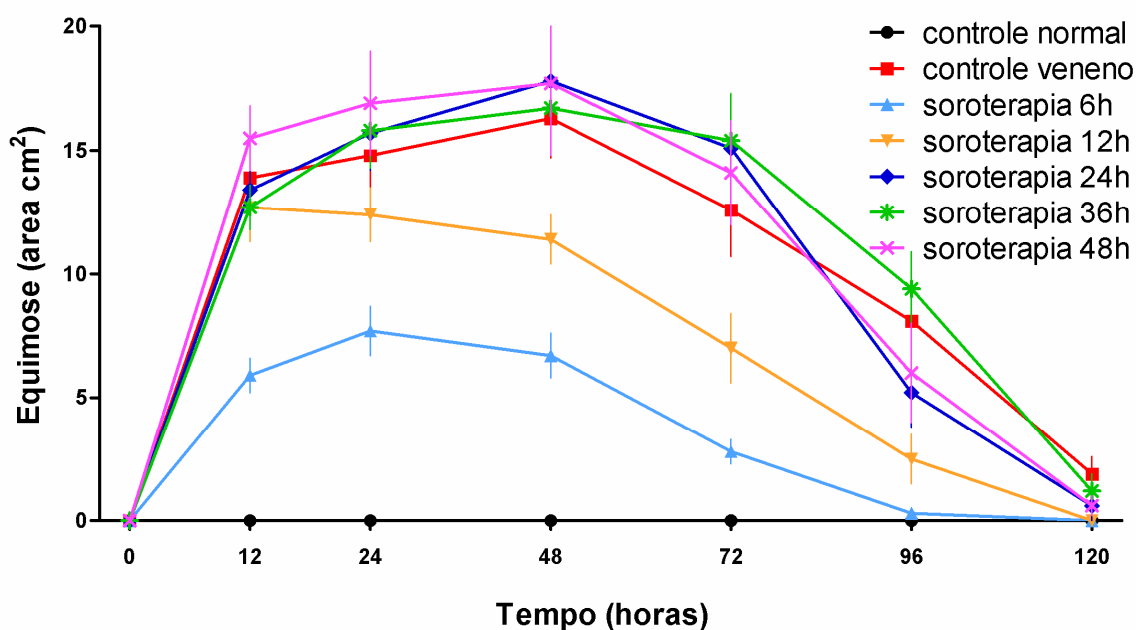


FIGURA 7 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA EQUIMOSE APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Área de equimose média (n= 12)  $\pm$  EPM medido nos tempos 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. O grupo soroterapia 6 h reduziu a equimose significativamente, ANOVA  $p < 0,05$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

### 5.3.4 Área Dermonecrótica

A área necrótica foi observada a partir de 12 horas em vários animais, porém a crosta necrótica atingiu o seu maior tamanho em 72 e 96 horas após a inoculação do veneno. O tamanho da lesão necrótica foi bastante variável, porém esta variabilidade se reproduziu em todos os grupos avaliados, conforme mostra o anexo 1, bem como o que é observado nos acidentes em humanos. Quando avaliados o controle veneno e os grupos que receberam soro antiloxoscélico após o envenenamento, as análises não-paramétricas demonstraram diferença estatística geral entre os mesmos ( $p < 0,000005$ ), o que foi confirmado através da diferença mínima significativa (DMS) em todos os grupos que receberam soro antiloxoscélico quando comparados individualmente ao veneno. A inibição da necrose pela ação do soro pode ser observada na figura 8. A área necrótica média dos animais avaliados no grupo que recebeu soroterapia 6 h foi de  $0,78 \text{ cm}^2 (\pm 0,19)$ , representando uma inibição da necrose na ordem de 87% em relação ao grupo controle veneno o qual apresentou necrose média de  $5,76 \text{ cm}^2 (\pm 1,40)$ . Os grupos que receberam tratamento com soro 12 h e 24 h apresentaram área necrótica média de  $1,17 \text{ cm}^2 (\pm 0,26)$  e  $2,44 \text{ cm}^2 (\pm 0,44)$  e, portanto, inibição da lesão necrótica em 80% e 58%, respectivamente. Nos grupos tratados 36 h e 48 h após o envenenamento a inibição da necrose foi de 37% e 27%.

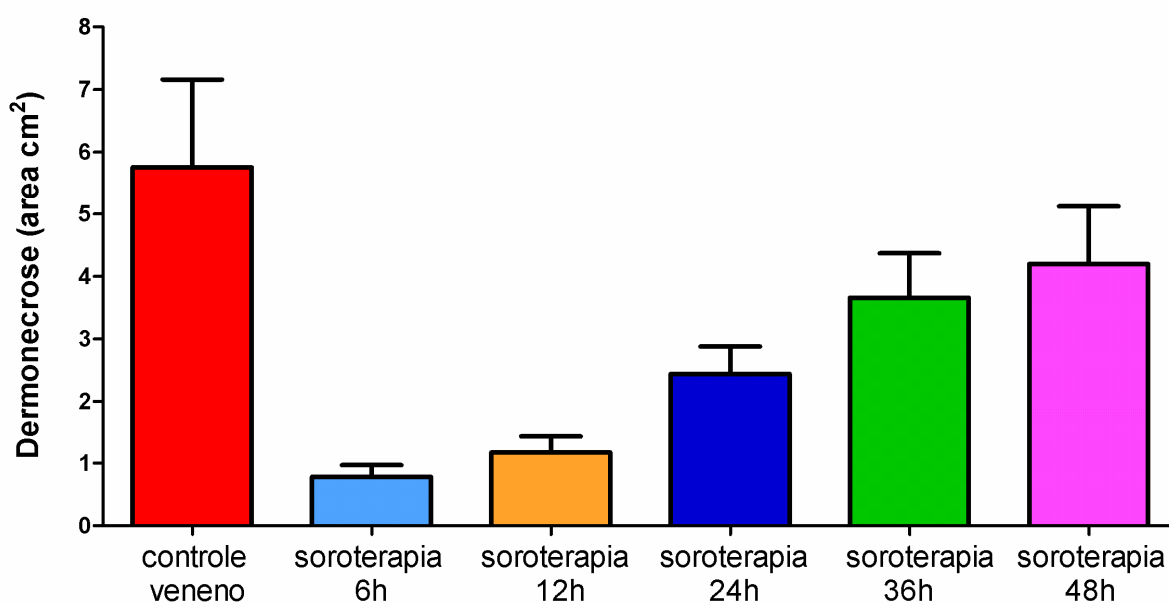


FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DA NECROSE EM SEU MAIOR TAMANHO INDEPENDENTE DO TEMPO DE LEITURA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Área de dermonecrose média ( $n = 15$ )  $\pm$  EPM medida a partir da crosta necrótica em sua maior área independente do tempo de avaliação nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. Todos os grupos soroterapia apresentaram inibição parcial da necrose, teste de Kruskal-Wallis  $p = 0,000005$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

As figuras 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam a seqüência fotográfica da evolução temporal do efeito da soroterapia aplicada em 6 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h após a inoculação do veneno de *L. intermedia*, através de um coelho que apresentou área dermonecrótica próxima da média do grupo avaliado.



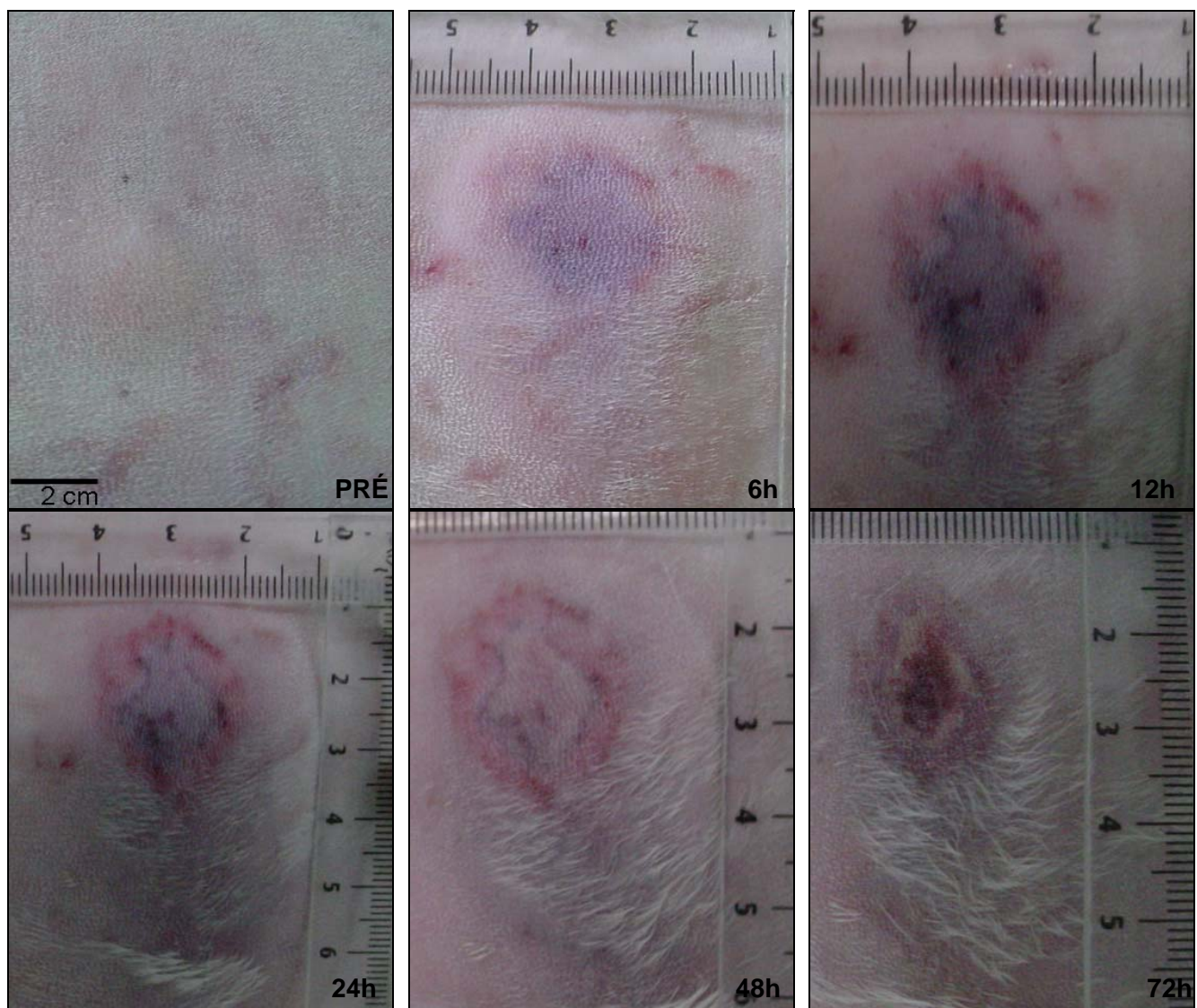


FIGURA 9 CONTINUA - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 6 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)



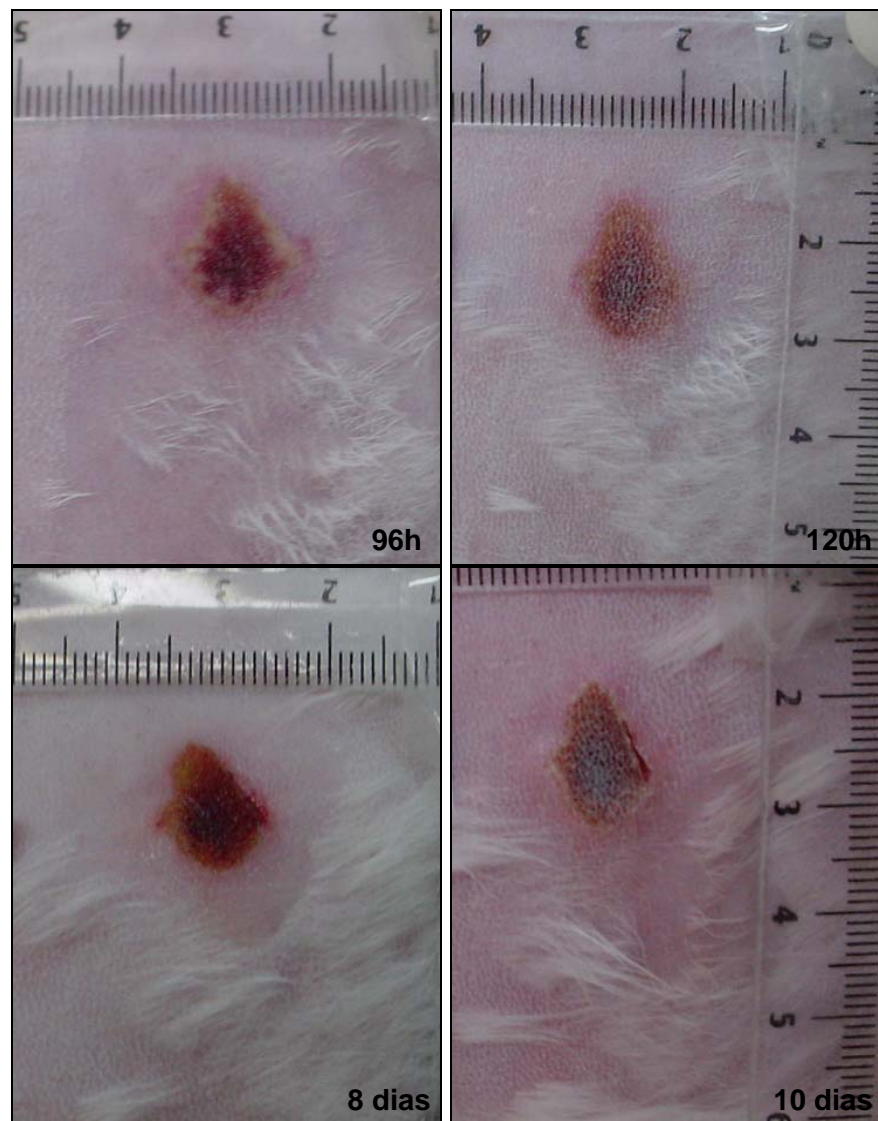


FIGURA 9 CONCLUSÃO - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 6 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)

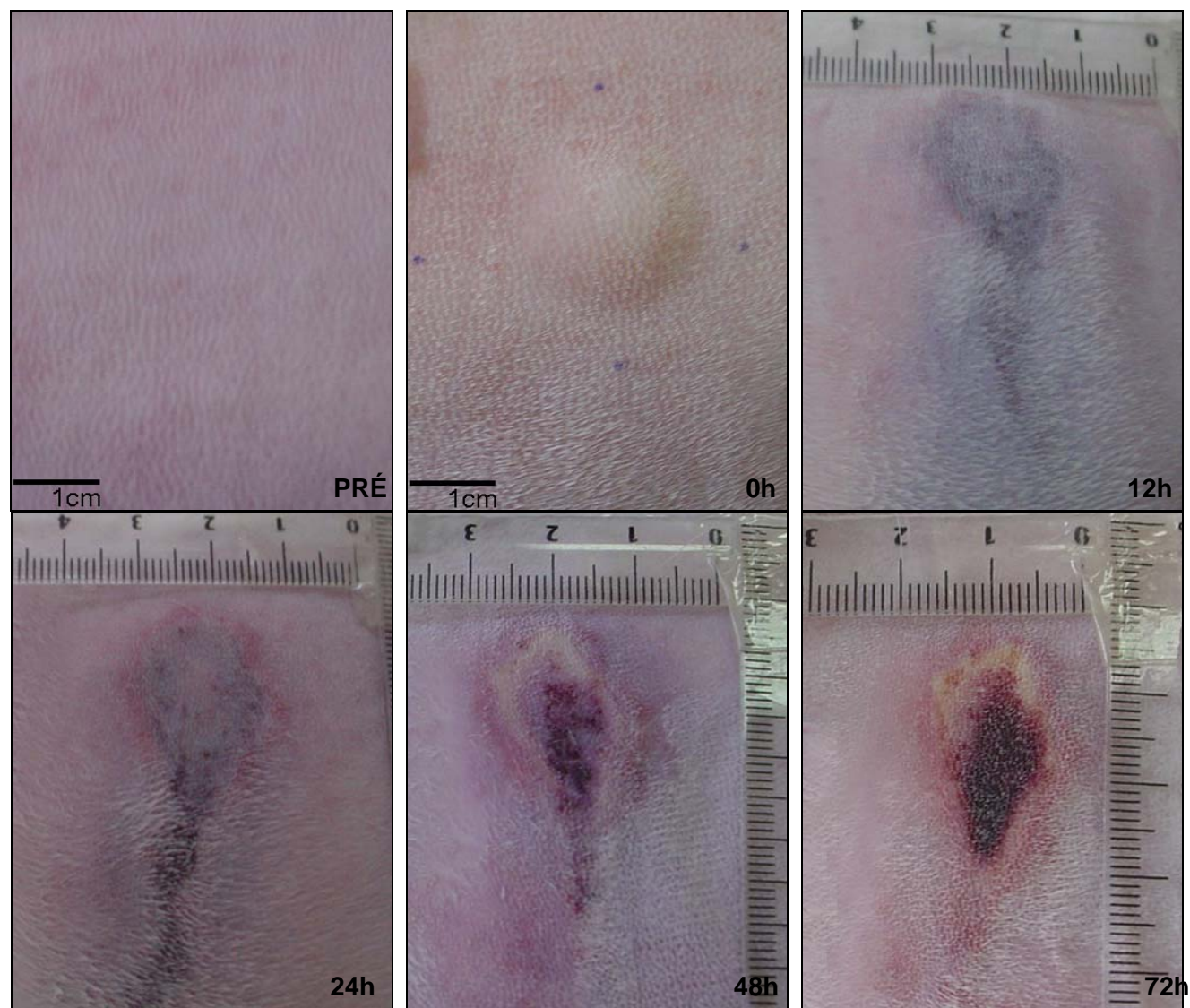


FIGURA 10 CONTINUA - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 12 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)

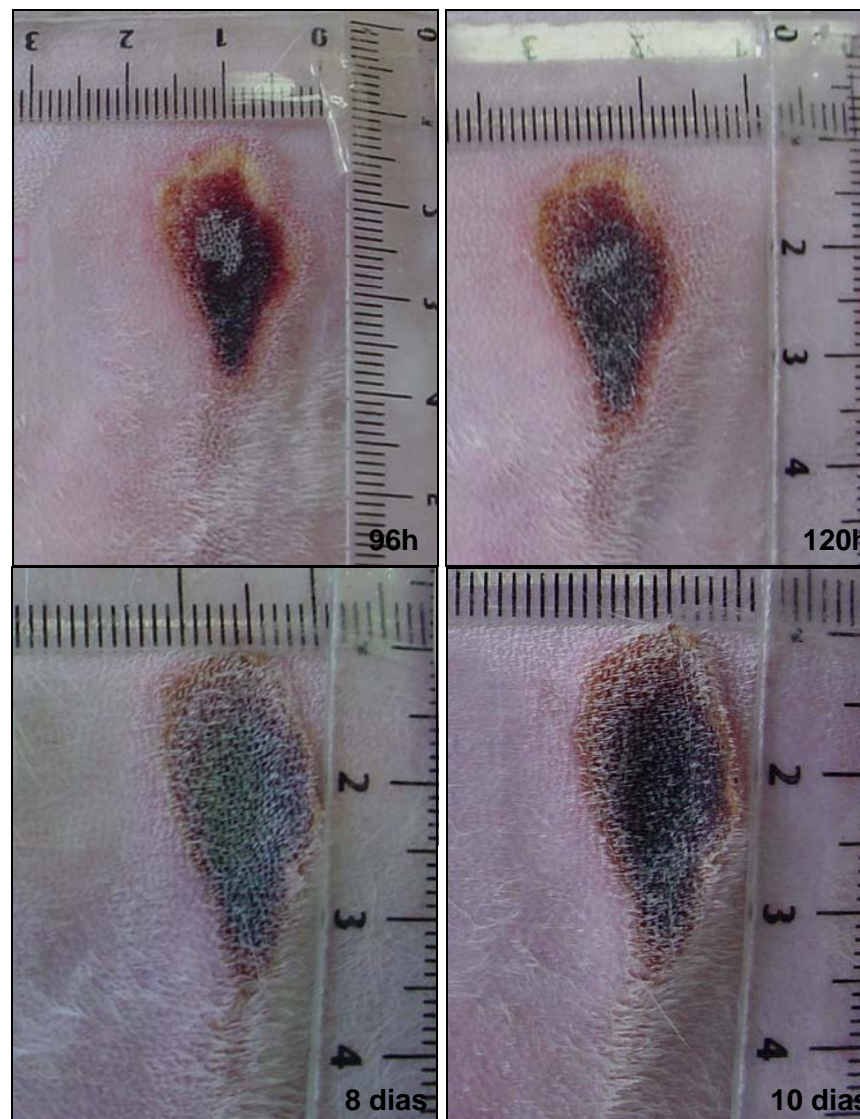


FIGURA 10 CONCLUSÃO - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 12 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)



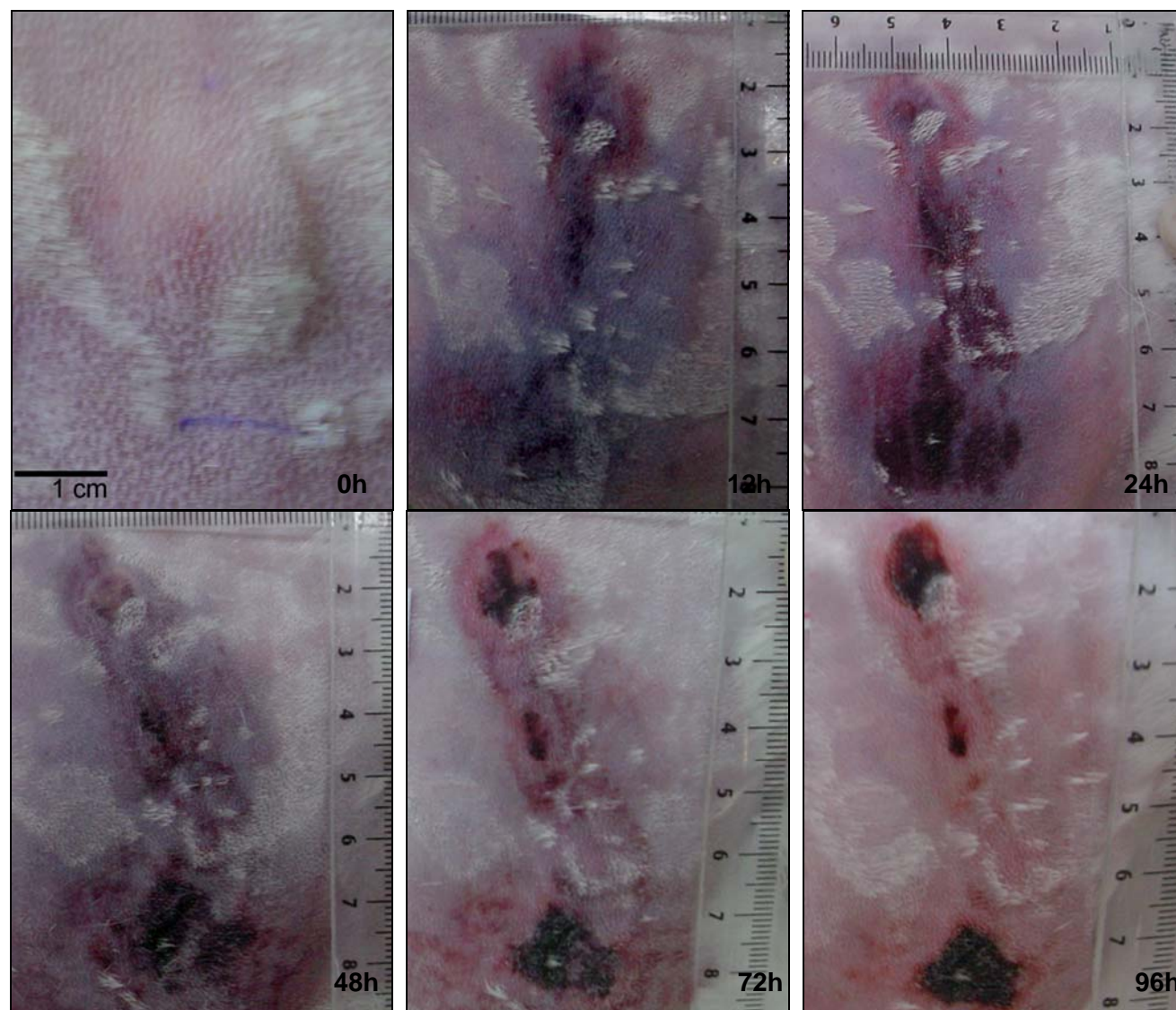


FIGURA 11 CONTINUA - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 24 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)

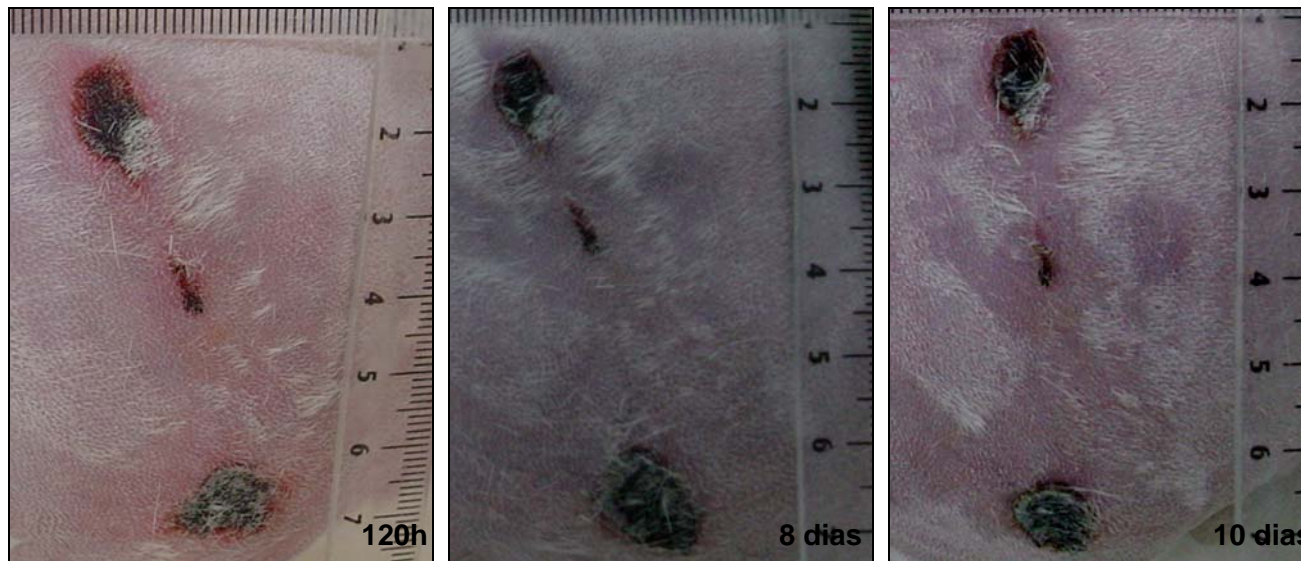


FIGURA 11 CONCLUSÃO - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 24 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)



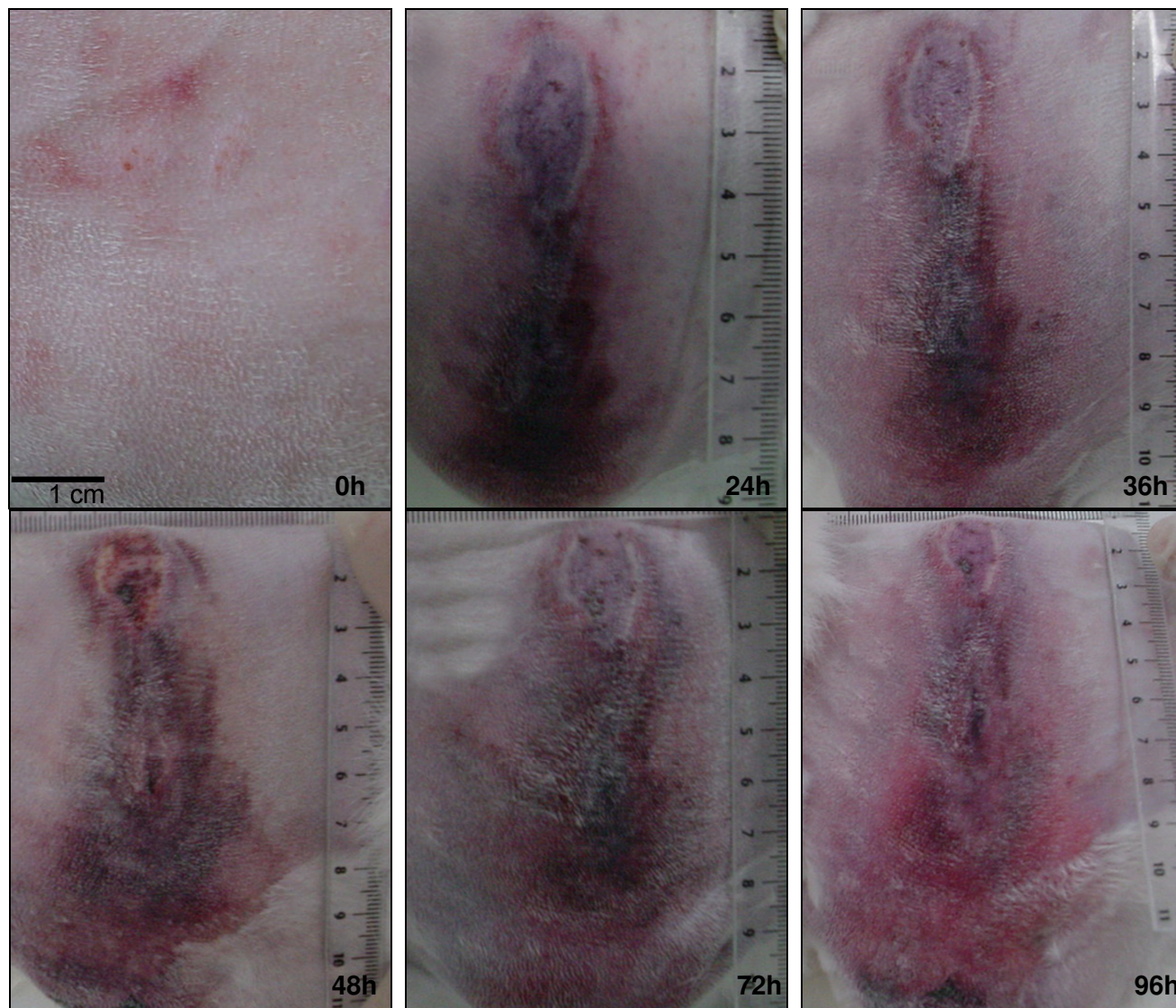


FIGURA 12 CONTINUA - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 36 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)

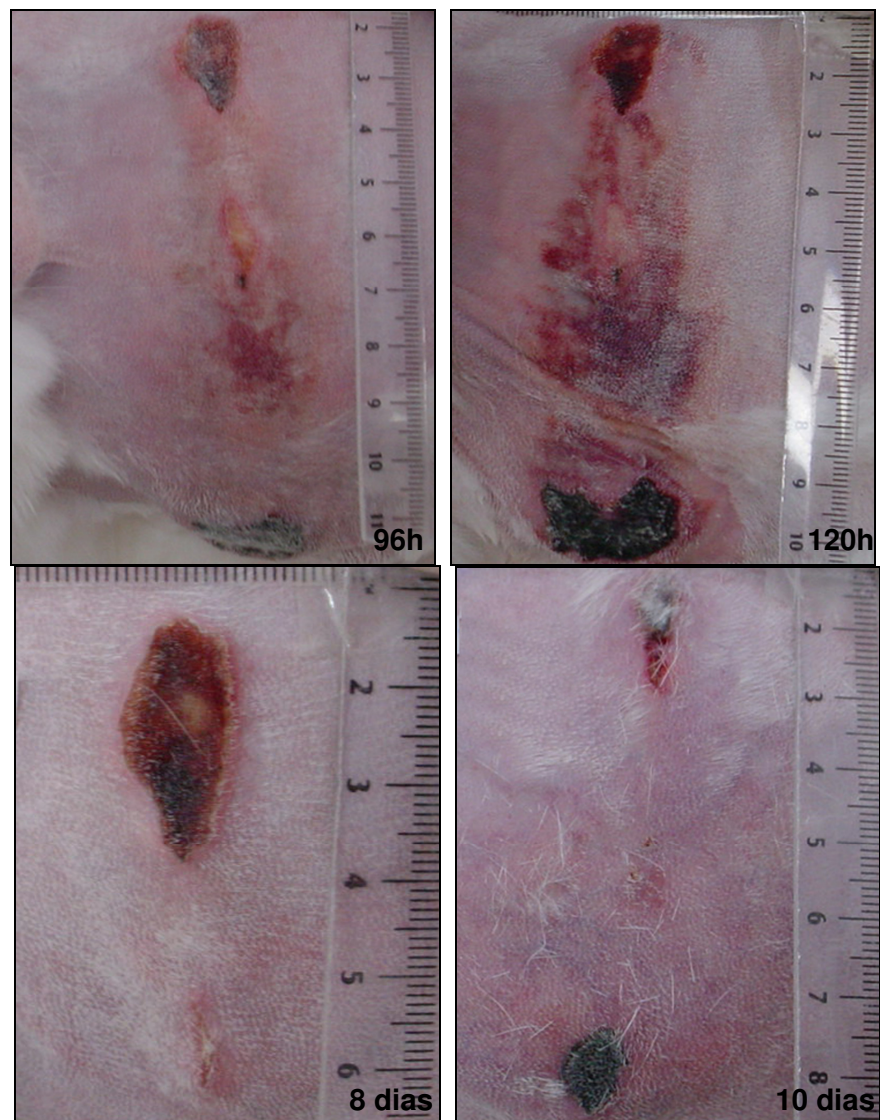


FIGURA 12 CONCLUSÃO - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 36 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)



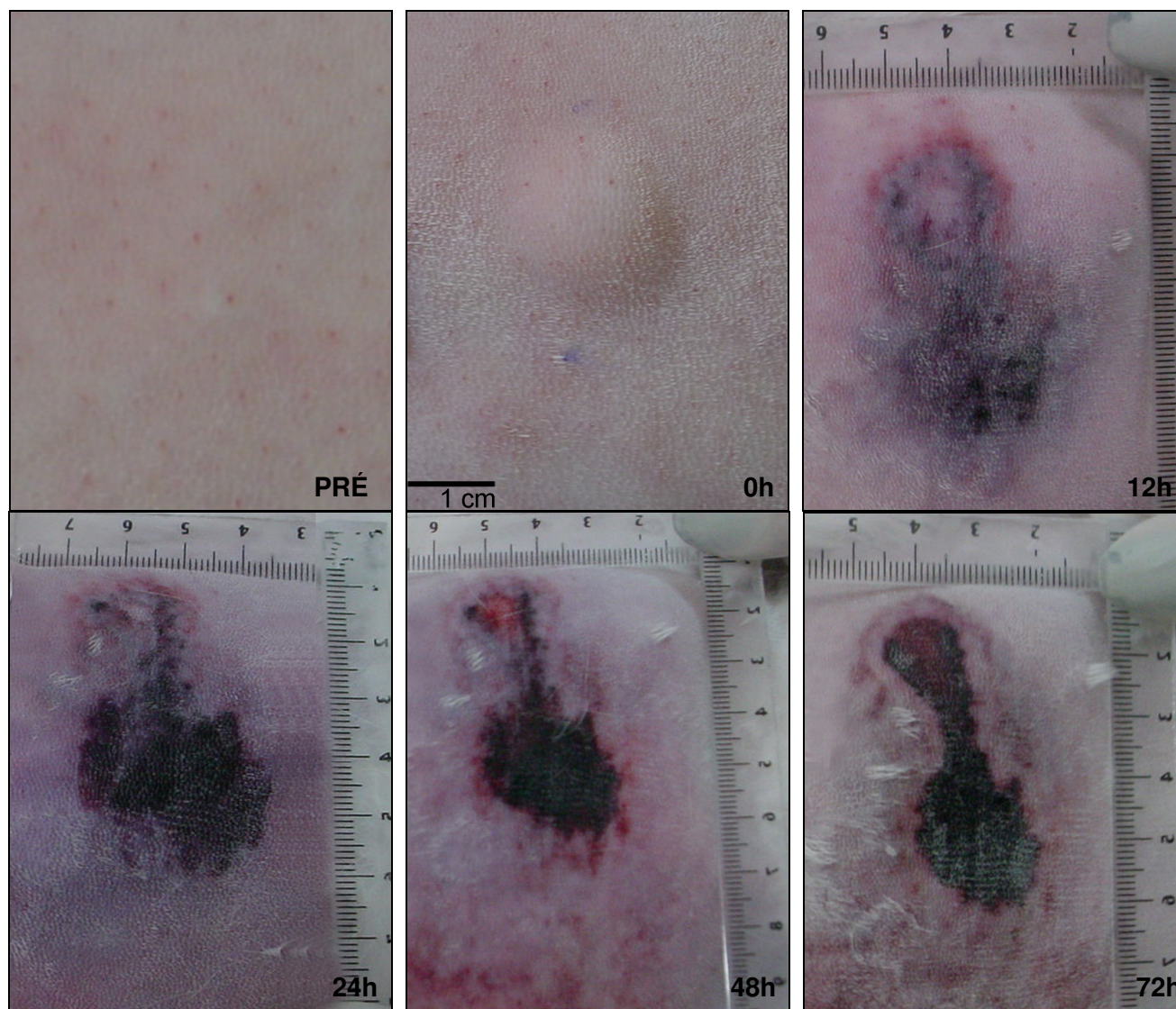


FIGURA 13 CONTINUA - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 48 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)



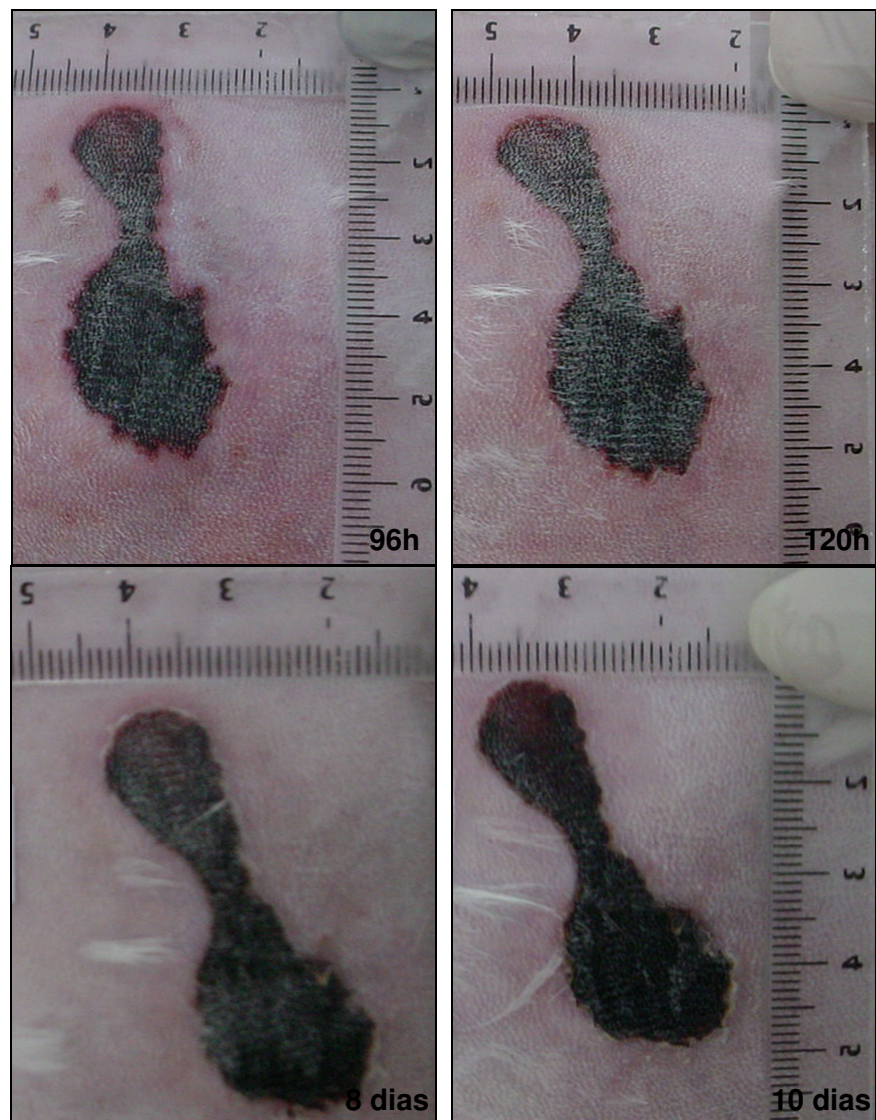


FIGURA 13 CONCLUSÃO - FOTOCINÉTICA DE COELHO REPRESENTATIVO DA MÉDIA EM ÁREA DERMONECRÓTICA NO GRUPO QUE RECEBEU SORO 48 h APÓS O ENVENENAMENTO. FONTE: O AUTOR (2008)

## 5.4 AVALIAÇÃO SISTÊMICA DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO NO ENVENENAMENTO COM ÊNFASE NA HEMOSTASIA: DOSAGEM DE FIBRINOGENO E CONTAGEM DE PLAQUETAS

### 5.4.1 Dosagem de Fibrinogênio

No grupo controle veneno a dosagem de fibrinogênio mostrou-se aumentada a partir de 12 horas após o envenenamento, sendo este aumento mais expressivo em 48 horas permanecendo significativamente aumentado até 240 horas. Em relação aos grupos que receberam soroterapia, o fibrinogênio apresentou diferença significativa tanto do ponto de vista do conjunto ( $p < 0,000001$ ) como no decorrer do tempo nos grupos de animais que receberam soroterapia em 6h ( $p < 0,05$ ) e 12h ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com o controle veneno. A ação do soro em diminuir os níveis de fibrinogênio mostrou-se significativa de 48 até 240 horas após a exposição ao veneno em ambos os grupos tratados citados (tabela 10 e figura 14). Não se observando diferença nos grupos que receberam soro mais tardiamente.

TABELA 10 - VALORES MÉDIOS ( $n = 12$ ) DA DOSAGEM DE FIBRINOGENO OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Fibrinogênio (mg/dL)						
	Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal	202,5	186,6	186,2	189,7	204,1	211,4	207,7
Controle Veneno	203,6	264,1	363,3	424,9	404,5	339,3	266,3
Soroterapia 6 h	200,7	233,8	322,3	335,1	325,3	291,7	233,4
Soroterapia 12 h	207,3	264,0	327,2	349,2	321,0	282,1	238,5
Soroterapia 24 h	208,2	261,9	357,7	438,6	376,6	329,0	244,4
Soroterapia 36 h	206,7	285,5	383,9	406,8	403,2	347,0	266,7
Soroterapia 48 h	215,2	267,7	354,4	401,7	393,2	342,7	254,6

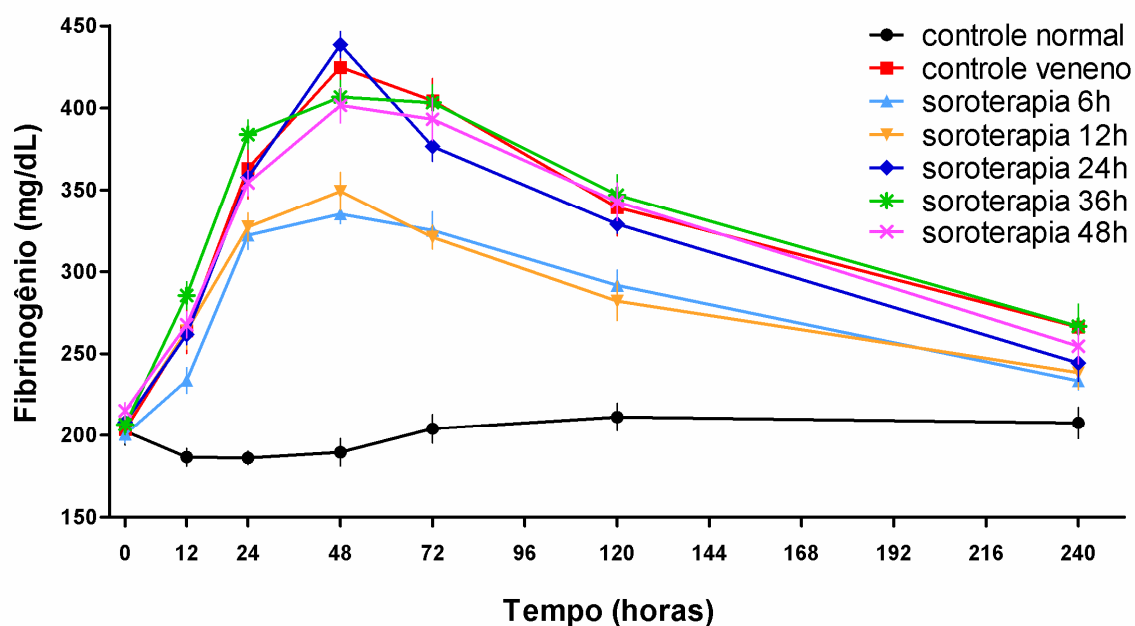


FIGURA 14 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA DOSAGEM DE FIBRINOGÊNIO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Dosagem de fibrinogênio média ( $n=12$ )  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. Os grupos soroterapia 6 e 12 h diminuíram significativamente o fibrinogênio, ANOVA  $p < 0,000001$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

#### 5.4.2 Contagem de Plaquetas

A contagem de plaquetas no grupo controle veneno diminuiu abruptamente (nos tempos 12 e 24 horas após o envenenamento, recuperando-se em 48 horas a níveis normais, no entanto apresentando um significativo aumento em 72 e 120 horas e diminuindo novamente em 240 horas, porém mantendo-se ainda superior ao valor observado no controle normal. Nos grupos que receberam soroterapia, a contagem de plaquetas apresentou diferença significativa somente no grupo que recebeu soro 6 h após a exposição ao veneno, esta diferença se mostrou tanto no conjunto ( $p=0,007$ ) como no decorrer do tempo ( $p < 0,000001$ ). A ação do soro na queda brusca de plaquetas observada no início do processo de envenenamento é evidenciada na recuperação do número de plaquetas no sangue periférico a partir de 24 horas. O aumento exacerbado no número de plaquetas circulantes que seguiu a

queda inicial também sofreu interferência pela ação do soro como pode ser observado na figura 15. Não se observou diferença nos grupos que receberam soroterapia mais tardiamente.

TABELA 11 - VALORES MÉDIOS (n= 12) DA CONTAGEM DE PLAQUETAS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Contagem de plaquetas ( $10^3/\text{mL}$ )						
		Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal		332,1	320,4	302,9	304,9	309,4	320,7	300,0
Controle Veneno		361,0	123,9	103,7	246,9	433,4	675,3	394,3
Soroterapia 6 h		347,1	142,7	169,2	311,1	436,67	440,5	322,0
Soroterapia 12 h		335	112,7	145,2	284,9	441,3	593,7	423,1
Soroterapia 24 h		324,8	149,2	144,7	253,3	390,8	569,6	384,2
Soroterapia 36 h		367,67	151,58	143,4	234,5	393,2	528,2	460,0
Soroterapia 48 h		329,7	130,4	146,2	298,7	418,1	628,6	433,7

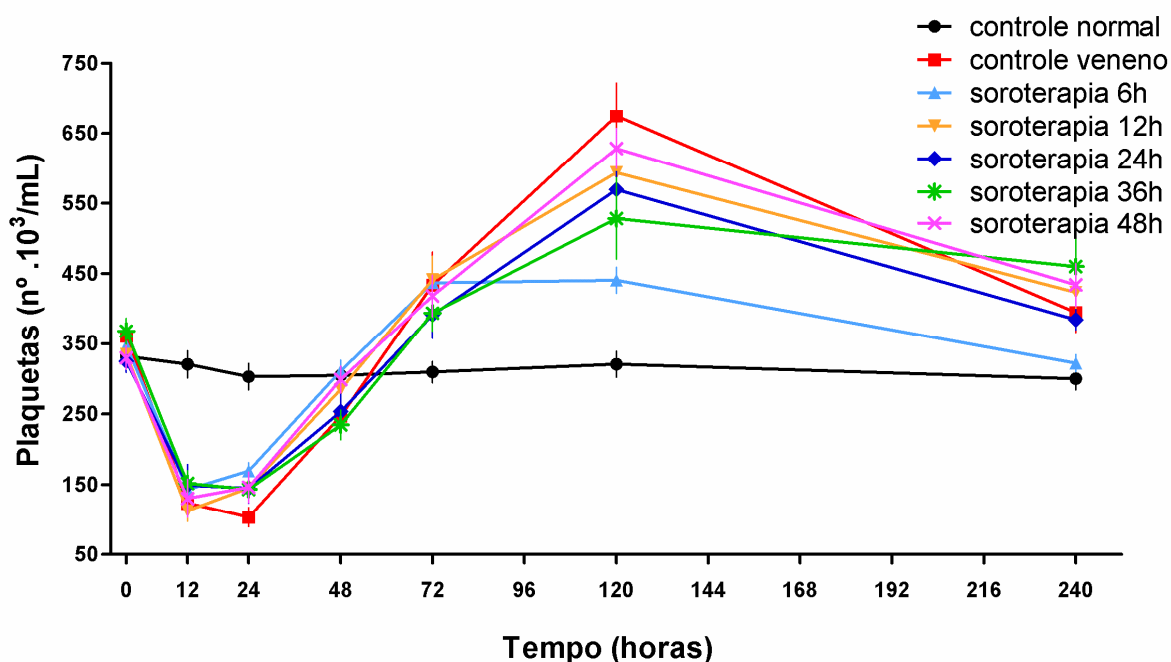


FIGURA 15 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE PLAQUETAS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Contagem de plaquetas média (n= 12)  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L.*

*intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. O grupo soroterapia 6 h interferiu significativamente na contagem de plaquetas, ANOVA  $p = 0,007$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

## 5.5 AVALIAÇÃO SISTÊMICA DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO NO ENVENENAMENTO COM ÊNFASE NA CELULARIDADE DO SANGUE PERIFÉRICO E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS: CONTAGEM DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E ERITRÓCITOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E HEMATÓCRITO

### 5.5.1 Contagem de Leucócitos

A contagem de leucócitos nos animais do grupo controle veneno mostrou significativa leucopenia 24 horas após a inoculação do veneno, sendo observado aumento em 48 horas e leucocitose significativa em 72 horas, mantendo-se aumentada até 120 horas. Os grupos que receberam soroterapia 6 h e 12 h após exposição ao veneno mostraram diferença significativa em relação à contagem de leucócitos tanto no conjunto ( $p < 0,05$ ) como no decorrer do tempo ( $p < 0,000001$ ) quando comparados com o grupo controle veneno. A ação do soro antiloxoscélico foi observada pela intervenção na leucopenia inicial transcorrido os períodos de 12 e 24 horas após as soroterapias testadas, respectivamente, e na subsequente leucocitose verificada no controle veneno, conforme mostra a tabela 12 e figura 16. Os grupos que receberam soro mais tardiamente, isto é em 24 h e 36 h não apresentaram diferença estatística. O grupo soroterapia 48 h apresentou diferença significativa em relação ao controle no tempo pré-envenenamento sendo excluído desta avaliação.

TABELA 12 - VALORES MÉDIOS (n= 12) DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Contagem de leucócitos ( $10^3/\text{mL}$ )						
		Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal		8,3	7,8	8,3	8,3	8,4	8,5	8,4
Controle Veneno		8,7	6,4	5,7	10,1	13,1	10,0	8,8
Soroterapia 6 h		8,6	9,7	8,9	9,2	9,1	9,2	8,3
Soroterapia 12 h		8,3	6,7	10,5	11,6	9,5	9,8	8,8
Soroterapia 24 h		8,2	6,7	6,1	12,0	12,8	9,5	8,9
Soroterapia 36 h		8,9	7,6	6,3	10,5	12,2	10,2	9,3

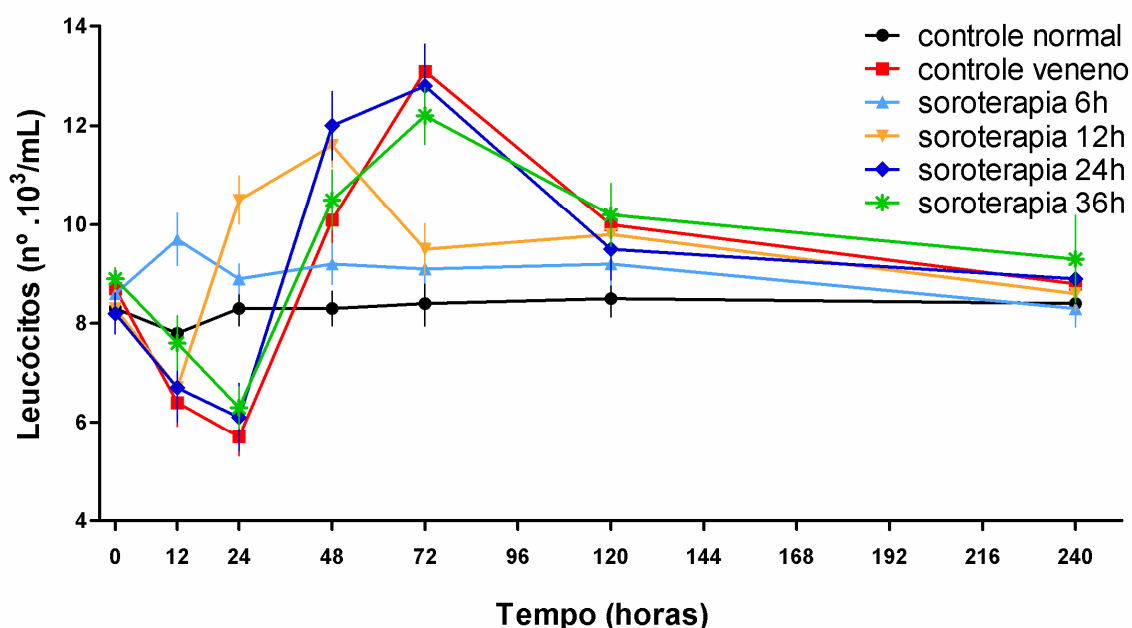


FIGURA 16 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Contagem de leucócitos média (n= 12)  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. Os grupos soroterapia 6 e 12 h interferiram significativamente na contagem de leucócitos, ANOVA  $p < 0,05$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

### 5.5.2 Contagem de Neutrófilos

O controle veneno apresentou decréscimo significativo na contagem de neutrófilos circulantes em 24 horas, seguido por significativa neutrofilia em 48 horas que se intensificou em 72 horas e permaneceu até 120 horas. Foi observado nos grupos que receberam soro antiloxoscélico em 6 h e 12 h após o envenenamento diferença significativa tanto no conjunto ( $p < 0,05$ ) como no decorrer do tempo ( $p < 0,000001$ ) quando comparados ao controle. A ação do soro no grupo soroterapia 6 h sobre a contagem de neutrófilos se expressou 12 horas após o envenenamento, interferindo tanto na neutropenia quanto na neutrofilia causada pelo veneno. No grupo soroterapia 12 h, a ação do soro foi observada a partir de 24 horas após a aplicação de veneno (tabela 13 e figura 17). Não se observou diferença estatística nos grupos que receberam soro mais tardiamente. O grupo soroterapia 48 h apresentou diferença significativa em relação ao controle no tempo pré-envenenamento (t zero) sendo excluído desta avaliação.

TABELA 13 - VALORES MÉDIOS (n= 12) DA CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Contagem de neutrófilos (10 <sup>3</sup> /mL)						
		Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal		4,5	4,0	4,5	4,3	4,5	4,1	4,4
Controle Veneno		4,6	5,1	3,5	5,5	8,3	5,4	5,3
Soroterapia 6 h		3,9	7,0	5,7	4,0	4,2	4,9	4,0
Soroterapia 12 h		4,2	5,5	7,4	6,7	5,6	4,4	4,4
Soroterapia 24 h		4,0	5,2	3,5	7,1	7,4	4,8	4,4
Soroterapia 36 h		4,2	5,8	4,2	5,6	7,5	5,9	5,6

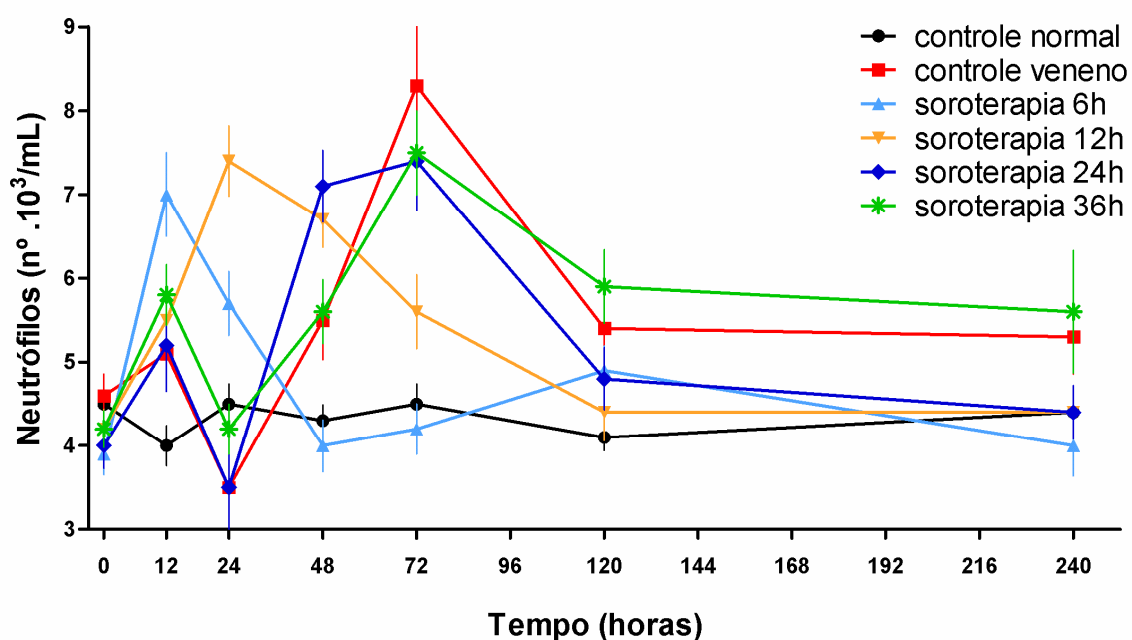


FIGURA 17 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Contagem de neutrófilos média ( $n=12$ )  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. Os grupos soroterapia 6 e 12 h interferiram significativamente na contagem de neutrófilos, ANOVA  $p<0,05$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

### 5.5.3 Contagem de Eritrócitos, Dosagem de Hemoglobina e Hematócrito

No controle veneno, a contagem de eritrócitos do sangue periférico, assim como a dosagem de hemoglobina e hematócrito, mostrou-se significativamente diminuídas nos tempos 48, 72, 120 e 240 horas quando comparadas ao controle normal. Nos grupos que foram tratados com soro observou-se diferença significativa quando comparados com o veneno somente no grupo que recebeu soro antiloxoscélico 6 h após o envenenamento (figuras 18, 19 e 20). A contagem de eritrócitos ( $p<0,0005$ ), hemoglobina e hematócrito ( $p<0,000001$ ) mostraram diferença significativa tanto conjunto como no decorrer do tempo ( $p<0,000005$ ). A ação do soro interferiu na queda destes parâmetros a partir de 48 horas após o envenenamento levando a recuperação dos mesmos a níveis normais (tabelas 14, 15 e 16).



TABELA 14 - VALORES MÉDIOS (n= 12) DA CONTAGEM DE ERITRÓCITOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Contagem de eritrócitos (10 <sup>6</sup> /μL)						
		Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal		5,97	5,81	5,58	5,53	5,38	5,35	5,55
Controle Veneno		5,96	5,76	5,50	4,88	4,64	4,78	5,29
Soroterapia 6 h		5,68	5,73	5,40	5,22	5,24	5,44	5,66
Soroterapia 12 h		6,05	5,87	5,44	4,76	4,93	4,95	5,60
Soroterapia 24 h		5,87	5,86	5,76	4,82	4,63	4,82	5,40
Soroterapia 36 h		5,73	5,81	5,56	5,03	4,82	4,98	5,48

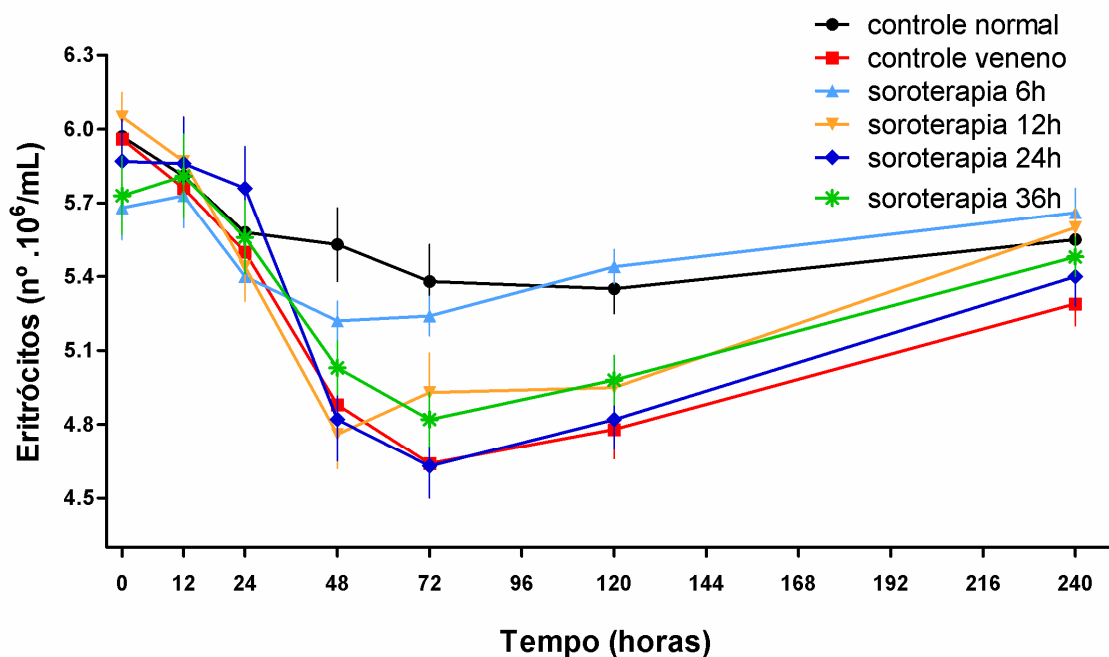


FIGURA 18 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA CONTAGEM DE ERITRÓCITOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Contagem de eritrócitos média (n=12)  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antilixoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. O grupo soroterapia 6 h reduziu significativamente a queda na contagem de eritrócitos, ANOVA  $p < 0,0005$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

TABELA 15 - VALORES MÉDIOS (n= 12) DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Hemoglobina (g/dL)						
		Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal		12,74	12,49	12,00	11,96	11,60	11,66	12,13
Controle Veneno		12,85	12,39	12,10	10,72	10,15	10,58	11,73
Soroterapia 6 h		12,38	12,40	11,83	11,27	11,41	11,95	12,65
Soroterapia 12 h		12,85	12,33	11,58	10,33	10,50	10,74	11,91
Soroterapia 24 h		12,53	12,43	12,00	10,24	9,97	10,50	11,78
Soroterapia 36 h		12,65	12,80	12,27	11,00	10,59	11,08	12,29

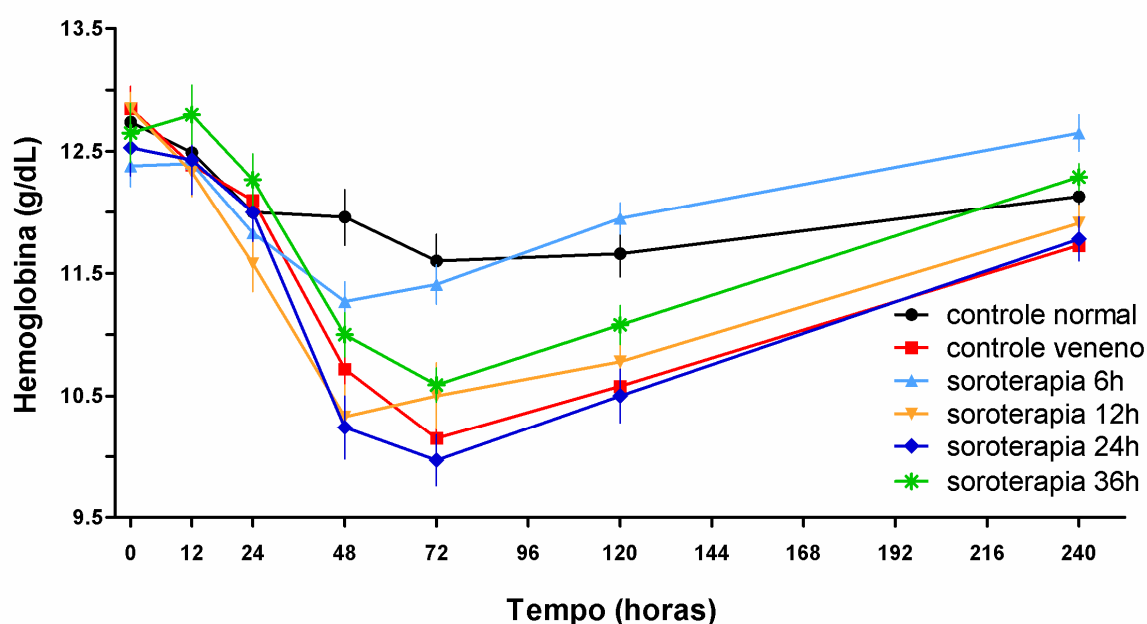


FIGURA 19 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Figura 10 Dosagem de hemoglobina média (n= 12)  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. O grupo soroterapia 6 h reduziu significativamente a queda na hemoglobina, ANOVA  $p < 0,000001$ . ID= intradérmica, IV= intravenoso

TABELA 16 - VALORES MÉDIOS (n= 12) DA DETERMINAÇÃO DE HEMATÓCRITO OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Grupos	Tempos	Hematócrito (%)						
		Zero h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	240 h
Controle Normal		38,05	37,24	36,10	35,69	34,91	35,02	36,56
Controle Veneno		38,35	36,75	35,62	31,77	30,22	31,38	35,05
Soroterapia 6 h		36,71	37,02	35,36	33,75	34,14	35,90	38,04
Soroterapia 12 h		38,53	36,64	34,58	30,61	31,18	31,66	35,55
Soroterapia 24 h		37,71	37,44	35,98	30,49	29,53	31,30	35,52
Soroterapia 36 h		37,53	38,15	36,67	32,78	31,57	33,13	37,01

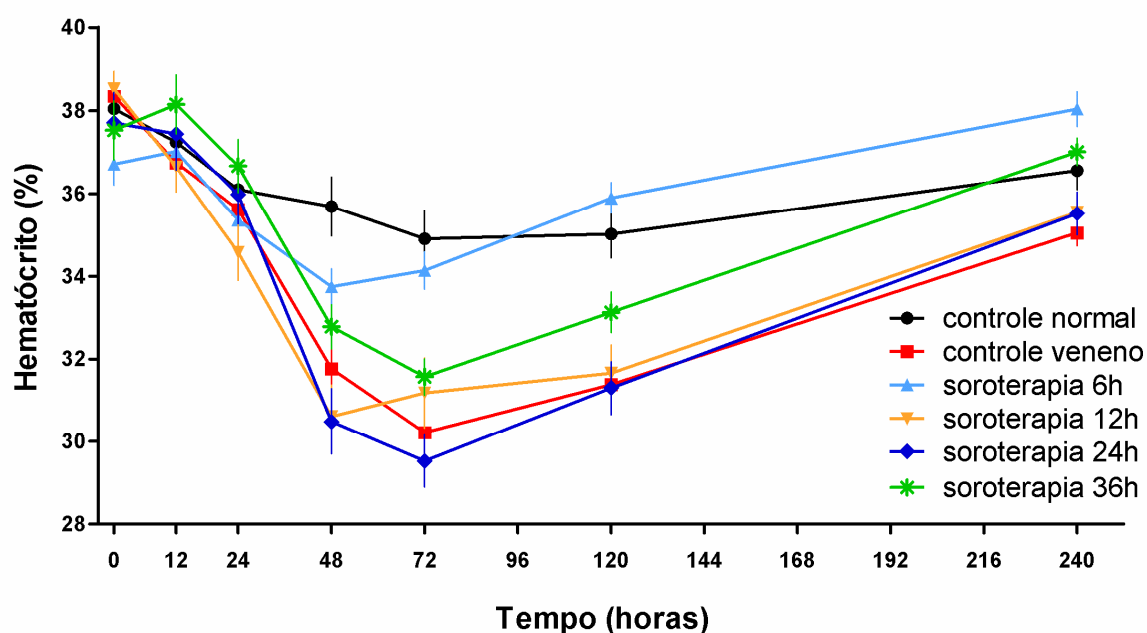


FIGURA 20 - AVALIAÇÃO CINÉTICA DO HEMATÓCRITO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Determinação de hematócrito média (n= 12)  $\pm$  EPM medida nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de veneno nos grupos de coelhos controle veneno (2 DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscólico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. O grupo controle normal (salina ID no dorso) foi avaliado nos mesmos tempos. O grupo soroterapia 6 h reduziu significativamente a queda no hematócrito, ANOVA  $p < 0,000001$ .

ID= intradérmica, IV= intravenoso

Adicionalmente, de modo geral, o estado dos animais testados foi benéficamente afetado depois da soroterapia, isso se mostrou de forma mais marcante nos animais que receberam soro antiloxoscélico até 24 horas, demonstrando em observação de comportamento estarem mais dispostos quanto à postura, mobilidade e ingesta de alimento, além de apresentarem fezes de maior consistência e menor ingesta de água em relação aos coelhos envenenados.

#### 5.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SORO ANTILOXOSCÉLICO QUANDO INJETADO ISOLADAMENTE

Para avaliar se o soro aplicado isoladamente poderia alterar os parâmetros analisados neste trabalho, foi utilizado um grupo de animais denominado controle soro que recebeu a mesma quantidade de soro antiloxoscélico que os grupos soroterapia, no entanto não foram inoculados com veneno. Não se observou diferença estatisticamente significativa no grupo que só recebeu soro antiloxoscélico em relação a nenhum dos parâmetros avaliados, quando comparado com o grupo normal, inoculado com solução salina. A tabela 17 mostra os resultados obtidos em ambos os grupos. Também não foi observado qualquer tipo de reação adversa como aumento de temperatura e reação alérgica, ou comportamento diferenciado do grupo controle normal. A figura 21 mostra fotos representativas da avaliação da pele de coelhos pertencentes aos grupos controle soro e controle normal.

TABELA 17 CONTINUA - VALORES MÉDIOS (n= 12) DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS OBSERVADOS NOS GRUPOS  
CONTROLE NORMAL E CONTROLE SORO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Ensaio	Média (EPM)						
Tempo	zeroh	12h	24h	48h	72h	120h	240h
Fibrinogênio (CN)	202,50 (8,36)	186,57 (5,48)	186,21 (4,14)	189,71 (8,34)	204,14 (8,84)	211,36 (8,52)	207,71 (9,72)
Fibrinogênio (CS)	205,36 (6,55)	197,57 (6,17)	201,71 (6,33)	200,43 (4,24)	204,64 (5,79)	195,43 (4,77)	197,50 (5,55)
Plaquetas (CN)	332,07 (19,72)	320,43 (19,37)	302,86 (18,87)	304,93 (15,98)	309,36 (14,94)	320,71 (18,41)	300,43 (15,69)
Plaquetas (CS)	356,64 (20,59)	357,50 (25,04)	330,14 (21,78)	337,79 (19,28)	338,29 (19,31)	345,50 (18,67)	351,64 (17,53)
Leucócitos (CN)	8,27 (0,29)	7,76 (0,35)	8,26 (0,35)	8,33 (0,35)	8,42 (0,45)	8,49 (0,37)	8,36 (0,37)
Leucócitos (CS)	8,68 (0,26)	8,10 (0,44)	8,66 (0,28)	8,84 (0,33)	8,62 (0,35)	8,56 (0,32)	8,41 (0,26)
Neutrófilos (CN)	4,48 (0,21)	4,01 (0,24)	4,52 (0,24)	4,26 (0,19)	4,48 (0,24)	4,21 (0,16)	4,43 (0,24)
Neutrófilos (CS)	4,82 (0,23)	4,22 (0,26)	4,85 (0,23)	4,73 (0,21)	4,82 (0,20)	4,65 (0,18)	4,56 (0,22)
Eritrócitos (CN)	5,97 (0,13)	5,81 (0,14)	5,58 (0,15)	5,53 (0,15)	5,38 (0,15)	5,35 (0,10)	5,55 (0,10)
Eritrócitos (CS)	5,80 (0,13)	5,60 (0,12)	5,51 (0,11)	5,29 (0,08)	5,25 (0,10)	5,35 (0,09)	5,51 (0,12)
Hemoglobina(CN)	12,74 (0,24)	12,49 (0,26)	12,00 (0,25)	11,96 (0,23)	11,60 (0,22)	11,66 (0,19)	11,16 (0,18)
Hemoglobina(CS)	12,64 (0,20)	12,29 (0,21)	12,07 (0,19)	11,71 (0,17)	11,70 (0,18)	12,00 (0,16)	12,18 (0,16)

TABELA 17 CONCLUSÃO - VALORES MÉDIOS (n= 12) DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NORMAL E CONTROLE SORO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Ensaio	Média (EPM)						
Tempo	zero h	12h	24h	48h	72h	120h	240h
Hematócrito (CN)	38,05 (0,73)	37,24 (0,75)	36,10 (0,77)	35,69 (0,71)	34,91 (0,67)	35,02 (0,57)	36,56 (0,46)
Hematócrito (CS)	37,94 (0,66)	36,65 (0,63)	35,99 (0,57)	34,79 (0,47)	34,93 (0,54)	35,86 (0,51)	36,79 (0,50)
Uréia (CN)	39,14 (2,30)	41,18 (2,35)	36,43 (1,95)	36,75 (1,73)	37,36 (1,65)	41,21 (1,91)	41,25 (1,74)
Uréia (CS)	39,32 (2,15)	44,79 (2,20)	40,54 (2,01)	40,57 (2,14)	40,75 (1,91)	42,64 (2,02)	42,29 (2,20)
Creatinina (CN)	0,93 (0,05)	0,83 (0,04)	0,90 (0,05)	0,89 (0,06)	0,91 (0,04)	0,96 (0,05)	1,01 (0,04)
Creatinina (CS)	1,00 (0,04)	0,86 (0,04)	0,93 (0,04)	0,89 (0,05)	0,91 (0,04)	0,93 (0,04)	0,96 (0,04)
ALT (CN)	42,57 (2,70)	41,64 (2,84)	43,36 (2,69)	44,25 (3,17)	45,18 (3,45)	44,00 (3,14)	40,29 (2,38)
ALT (CS)	46,68 (2,90)	43,93 (3,20)	46,14 (2,87)	42,79 (2,80)	43,86 (2,73)	45,93 (3,27)	44,04 (3,99)
AST (CN)	31,79 (2,67)	25,93 (1,54)	31,43 (2,52)	31,68 (3,80)	31,21 (3,23)	30,14 (2,90)	26,68 (3,00)
AST (CS)	29,36 (2,31)	23,18 (1,60)	29,21 (2,25)	28,78 (2,12)	27,21 (3,49)	26,96 (2,67)	23,57 (2,38)

Parâmetros sistêmicos expressos em média (n= 12)  $\pm$  EPM medidos nos tempos zero, 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação de soro antiloxoscélico (4 mL por coelho IV) no grupo controle soro e (200  $\mu$ L de salina ID no dorso) no grupo controle normal. O grupo controle soro não apresentou diferença significativa, ANOVA  $p > 0,05$  quando comparado com o controle normal em nenhum dos parâmetros avaliados. ID= intradérmica; IV= intravenoso; CN= controle normal; CS= controle soro

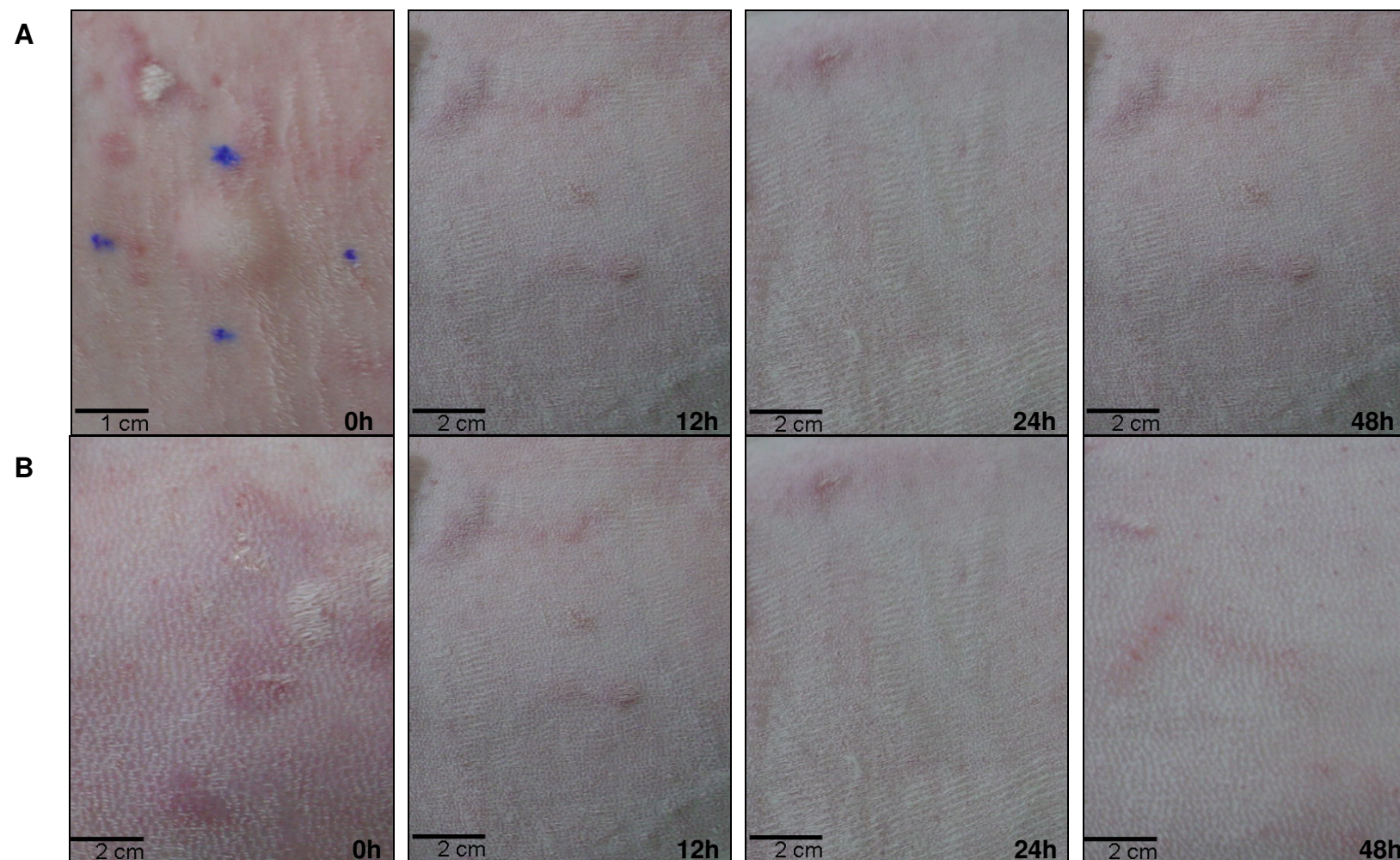


FIGURA 21- FOTOS REPRESENTATIVAS DA AVALIAÇÃO DA PELE DE COELHOS DOS GRUPOS: **A**- CONTROLE NORMAL E **B**- CONTROLE SORO. FONTE: O AUTOR (2008) NOTA: Os animais foram observados até 240h, não apresentando alterações cutâneas.

## 6. DISCUSSÃO

Várias intervenções para o tratamento do envenenamento loxoscélico já foram propostas e testadas (PAULI *et al.*, 2006). No entanto, estas pesquisas foram inconclusivas e com poucas evidências para suportar a variedade de tratamentos (FUTRELL, 1992; PHILLIPS *et al.*, 1995; SAMS *et al.*, 2001; WENDELL, 2003; SWANSON e VETTER, 2006). De todas as terapias propostas, o antiveneno vem sendo citado como o medicamento de maior potencial se administrado nas primeiras horas após o envenenamento (REES *et al.*, 1981; FUTRELL, 1992; GOMEZ *et al.*, 1999; HOGAN *et al.*, 2004). A habilidade de anticorpos específicos na neutralização da atividade dermonecrótica dos venenos de aranhas *Loxosceles* já foi discutida e comprovada por vários autores (FURLANETO, 1961; REES *et al.*, 1981; BRAVO *et al.*, 1994; BRAZ *et al.*, 1999; GOMEZ *et al.*, 1999; GUILHERME *et al.*, 2001; BARBARO *et al.*, 2005, DE ROODT *et al.*, 2007).

Uma das questões mais importantes a serem respondidas no loxoscelismo é o tempo ideal para se administrar a soroterapia, e neste sentido, vários estudos através de diferentes protocolos buscaram correlacionar o tempo de envenenamento com a aplicação do antiveneno loxoscélico (FURLANETTO, 1961; REES, 1981; BRAVO *et al.*, 1994; GOMEZ *et al.*, 1999; GUILHERME *et al.*, 2001).

Já foi demonstrada a efetividade do antiveneno quando este é aplicado precocemente, portanto buscamos abordar neste trabalho a capacidade do soro antiloxoscélico em interferir na cinética do envenenamento por *L. intermedia* determinando até que momento o antiveneno interfere beneficemente neste processo.

Os coelhos expostos ao veneno de *L. intermedia* demonstraram que os primeiros parâmetros sistêmicos alterados pelo veneno foram a contagem de plaquetas, com abrupta queda inicial, e o aumento nos níveis de fibrinogênio (figura 2), tendo isto ocorrido em dezoito horas após a aplicação do veneno, primeiro tempo avaliado na cinética do envenenamento. O número de leucócitos mostrou-se diminuído em 12 horas, tendo se observado significativa leucopenia acompanhada de intensa neutropenia em 24 horas (figura 3). A série vermelha se apresentou diminuída significativamente a partir de 48 horas da exposição ao veneno (figura 4).

TAVARES *et al.* (2004), observaram com veneno de *L. gaucha* aumento significativo de fibrinogênio de 24 horas a 120 horas, último tempo avaliado. Este



aumento condiz com o observado nas primeiras 12 horas permanecendo até 240 horas. Citocinas como as interleucinas IL-1 e IL-6 geradas durante o processo inflamatório e necrótico podem estimular a síntese de fibrinogênio e justificar este aumento (SCHULTZ e ARNOLD, 1990). A necrose iniciada em 12 horas no grupo controle veneno apresentou o seu maior tamanho, expresso em crosta necrótica, em 72 horas e 96 horas após a inoculação do veneno, demonstrando a franca evolução do processo necrótico até tempos mais tardios, o que poderia explicar a manutenção dos níveis altos de fibrinogênio.

A diminuição intensa na contagem de plaquetas circulantes em 12 horas e o decréscimo de leucócitos neste período, assim como o pico máximo de leucopenia e plaquetopenia em 24 horas, foram também observados em experimentos com venenos de *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles gaucho* (DA SILVA *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2004), com exceção da plaquetopenia máxima observada em 12 horas o que foi demonstrado para *L. intermedia* (DA SILVA *et al.*, 2003). Do mesmo modo, a neutropenia inicial observada foi seguida por leucocitose neutrofílica a partir de 72 horas, acompanhada de significativo aumento de plaquetas neste mesmo período.

A leucopenia e a trombocitopenia inicial podem ser explicadas pelo papel exercido pelas plaquetas na formação do trombo durante o processo hemorrágico, pela interação de plaquetas e leucócitos no processo inflamatório (FUTRELL, 1992) e pela migração de leucócitos em especial de neutrófilos para o local do dano tecidual (OSPEDAL *et al.*, 2002; ZANETTI *et al.*, 2002). A ação do veneno no endotélio vascular seqüestrando e ativando de forma desregulada os neutrófilos circulantes e a cascata de eventos bioquímicos que se seguem (PATEL *et al.*, 1994; PALUDO *et al.*, 2006), culminando na síntese exacerbada de neutrófilos e plaquetas, podem explicar o aumento posterior destas células no sangue periférico dos animais expostos ao veneno. Não foram observadas em nosso estudo alterações morfológicas nas células sanguíneas avaliadas.

As quedas nas contagens de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito observadas a partir de 48 horas e que se estenderam até 10 dias podem ser devidas ao exuberante processo hemorrágico observado nos animais testados. Não foi observada nas amostras coletadas a presença de hemólise macroscópica. No estudo de TAVARES *et al.* (2004), resultados semelhantes foram obtidos, e nenhuma evidência de hemólise intravascular foi verificada, tendo a pesquisa de

hemoglobina plasmática se mostrando normal. A não observação de hemólise intravascular pode ser também explicada pela ausência de glicoforinas na superfície dos eritrócitos de coelhos e que se encontram presentes nas células humanas levando a hemólise mediada por complemento (TAMBOURGI *et al.*, 2000, 2007).

Apesar de serem observados nos pacientes com loxoscelismo cutâneo-visceral, alterações nos níveis séricos de transaminases, e em casos de insuficiência renal, aumento de uréia e creatinina (BARBARO E CARDOSO, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2007), não há relatos na literatura de alterações destes dois últimos parâmetros em coelhos expostos experimentalmente ao veneno de *Loxosceles*. O presente trabalho também não observou nos animais envenenados diferenças significativas nos níveis de uréia e creatinina. Quanto às transaminases ALT e AST, não foram observadas nas condições experimentadas diferenças nos animais expostos ao veneno de *L. intermedia* e o grupo controle sem exposição ao veneno. Já em estudo realizado com *L. gaucho* os níveis séricos de ALT e AST apresentaram-se aumentados no tempo 24 h após exposição ao veneno (TAVARES *et al.*, 2004). Em recente estudo realizado em ratos (CHRISTOFF, 2008), foi demonstrado que o veneno de *L. intermedia* apresenta efeito citotóxico agudo sobre o fígado com aumento das transaminases em até 6 h após a inoculação do veneno total.

É sabido que a maioria dos efeitos nocivos da aranha marrom se manifesta precocemente, entre 3 e 6 h após a inoculação experimental de veneno (REES *et al.*, 1981; WASSERMAN e ANDERSON, 1983–84; PATEL *et al.*, 1994; OSPEDAL *et al.*, 2002), e que a toxicidade do veneno sobre o endotélio dos vasos contribui para a vasodilatação, eritema, edema e equimose que aparecem nas primeiras horas. Verificamos em nosso estudo a ação do veneno já nos primeiros 90 minutos com a instalação de eritema, edema e equimose, sendo a presença de dermonecrose observada a partir de 12 h. Os animais envenenados apresentaram também pico máximo de temperatura em 12 h (40,6 °C), permanecendo esta ainda elevada até 48 h (39,7 °C), sendo que no tempo zero a temperatura média do grupo foi de 39,1 °C. A quantidade de veneno utilizada provocou intensa reação inflamatória e hemorrágica seguida pelo crescimento da área necrótica atingindo seu máximo em 72 h a 96 h após a exposição do veneno (figura 1).

A ação do soro antiloxoscélico no envenenamento é considerada tempo e dose dependente (REES *et al.*, 1981). Em estudo realizado por GOMEZ *et al.*, (1999), a inibição total da necrose e inflamação dérmica foi observada quando o

antiveneno foi aplicado 4 h após a inoculação de veneno de *L. deserta*. Já em estudo realizado por DE ROODT *et al.* (2007), o antiveneno intravenoso foi capaz de inibir a atividade necrótica em 72% e 67% quando inoculado 60 e 150 minutos respectivamente após a exposição ao veneno de *L. boneti*. Vale ressaltar que diferenças bioquímicas e biológicas são amplamente descritas entre os venenos das diferentes espécies de *Loxosceles sp.* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLVERA *et al.*, 2006; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007)

O soro antiloxoscélico administrado 6 h e 12 h após a inoculação do veneno de *L. intermedia* interferiu de forma significativa em vários parâmetros durante a cinética do envenenamento experimental em coelhos. A ação do soro foi revelada por meio de eventos que são ativados muito precocemente como é o caso de alterações do número de plaquetas, leucócitos e neutrófilos, que são observadas já nas primeiras 3 a 4 h (TAVARES *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2003) após a inoculação do veneno. O efeito redutor da toxicidade do veneno pôde ser visualizado mesmo em tempos considerados tardios tendo em vista a indução praticamente instantânea da cascata de eventos inflamatórios.

A soroterapia em 6 h e 12 h interferiu significativamente também no curso de evolução do fibrinogênio (figura 14), sendo uma proteína de fase aguda, altamente estimulada nas primeiras horas pelo processo inflamatório após o envenenamento como demonstrado por nossos resultados, tendendo a normalizar os níveis de fibrinogênio que foram elevados. Também se mostrou efetiva em relação ao processo hemorrágico, visto observar-se menor decréscimo na contagem de eritrócitos, bem como nos índices hematimétricos no grupo tratado em 6 h (figuras 18, 19 e 20). Contudo, a soroterapia aplicada em 24 h, 36 h e 48 h após o envenenamento não demonstrou diferença significativa entre os animais tratados e o controle veneno em relação aos parâmetros sistêmicos avaliados.

Apesar da precocidade da instalação do processo inflamatório observado em nosso trabalho, o soro antiloxoscélico inoculado 6 h e 12 h após o envenenamento apresentou significativa redução na evolução do eritema e edema conforme mostram as figuras 5 e 6. A equimose foi reduzida marcadamente quando foi aplicado soro em 6 h após o envenenamento (figura 7). Tal observação apresenta coerência com a ação do soro sobre plaquetas e eritrócitos somente no grupo soroterapia 6h. A rapidez na ativação da reação inflamatória provocada pelo veneno da aranha *Loxosceles* foi também observada no trabalho de BRAVO *et al.* (1994), no

qual foi inoculada 1 DMN de veneno de *L. laeta* e antiveneno por via intravenosa 1 h após, demonstraram que o antiveneno apesar de inibir completamente a dermonecrose, não foi capaz de evitar a reação inflamatória local.

Estudos avaliando a dermonecrose têm demonstrado o efeito do soro antiloxoscélico na neutralização do veneno e conseqüente inibição da necrose dérmica, como observada no trabalho de FURLANETTO (1961), o qual obteve inibição total da necrose utilizando antiveneno anti *L. rufenses* por via intravenosa 4 h após a exposição do veneno e redução de 50% da lesão quando o antiveneno foi aplicado 16 a 24 h. GUILHERME *et al.* (2001), também observaram inibição de 76% da área necrótica com soro policlonal eqüino anti *L. gaúcho* inoculado também por via intravenosa 12 h após o veneno.

Nossos resultados vêm de encontro aos achados de FURLANETTO (1961) e GUILHERME *et al.* (2001), sendo observado em nosso experimento percentuais de inibição de 87% da área necrótica nos animais que receberam soro antiloxoscélico 6 h após o veneno e de 80% nos que receberam 12 h após o envenenamento. No grupo tratado em 24h a inibição da área necrótica foi de 57%, sendo de 37% e 27% nos coelhos que receberam antiveneno 36 h e 48 h respectivamente após a inoculação intradérmica do veneno. Esses resultados reforçam a ação do soro antiloxoscélico na neutralização do veneno e inibição parcial da necrose dérmica em coelhos mesmo quando administrado tão tardiamente quanto 48 h após o envenenamento experimental.

Sabemos que não é possível correlacionar modelos animais diferentes. No entanto, os estudos experimentais sempre serviram de base para a clínica médica e inferências são sempre possíveis e abrem espaço para novas averiguações. Deste modo, não podemos deixar de salientar que a maioria dos pacientes que se apresentam para o tratamento médico não apresentam dermonecrose, como evidenciado no estudo de MÁLAQUE *et al.* (2002), em que a maioria dos pacientes atendidos antes ou até 72h não tinha necrose. Sugerindo que seu desenvolvimento em seres humanos é um processo que progride mais vagarosamente que em coelhos (GUILHERME *et al.*, 2001; BARBARO *et al.*, 2005). Assim como não podemos deixar de ressaltar que os animais inoculados experimentalmente com veneno de *L. intermedia* já apresentavam dermonecrose em desenvolvimento 12 horas após a inoculação do veneno e que mesmo assim o antiveneno interferiu de forma significativa na evolução do processo de envenenamento quando comparado

com o controle veneno.

Acreditamos que a inibição da área necrótica nos animais submetidos a soroterapia nos tempos 24 h, 36 h e 48 h após o inoculação de veneno, deva-se a neutralização de quantidade de veneno não suficiente para alterar de forma significativa os parâmetros aqui avaliados, mas suficiente para agir de forma cumulativa e interferir no desenvolvimento da área necrótica. Finalmente, os resultados obtidos apontam que a soroterapia contribui para o restabelecimento dos parâmetros sistêmicos e, mesmo posterior ao surgimento da lesão dermonecrotica, é benéfico do ponto de vista da progressão do tamanho da lesão e, consequentemente, em relação à redução do tempo de convalescença.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho em relação ao efeito do veneno de *L. intermedia* e a ação do soro antiloxoscélico aplicado em coelhos em diferentes intervalos de tempo após o envenenamento nos permite as seguintes conclusões:

1. O veneno de *L. intermedia* inoculado experimentalmente em coelhos é capaz de provocar alterações cutâneas como edema, eritema e equimose a partir de 90 minutos de sua exposição e área necrótica em crescimento a partir de 12 h.
2. O veneno de *L. intermedia* altera significativamente parâmetros sistêmicos como dosagem de fibrinogênio e contagem de plaquetas já nas primeiras 12 h após a sua inoculação, leucócitos e neutrófilos em 24 horas, enquanto que a contagem de eritrócitos, a dosagem de hemoglobina e hematócrito são alteradas pelo veneno a partir de 48 h.
3. O veneno de *L. intermedia* não altera os parâmetros bioquímicos, tais como uréia, creatinina, ALT e AST, nas condições experimentadas.
4. O soro antiloxoscélico ministrado em 6 h e 12 h após o envenenamento é capaz de interferir de forma benéfica na cinética do envenenamento em relação aos parâmetros cutâneos e sistêmicos avaliados, culminando na redução relativa de 87% e 80% da área necrótica quando aplicado e em 6 h e 12 h respectivamente. E redução de 58% e 37% quando aplicado em 24 h e 36 h em comparação com o desenvolvimento da lesão nos coelhos envenenados.
5. O soro quando ministrado até 48 h ainda é capaz de reduzir de forma significativa em 27% o tamanho da área necrótica provocada pelo veneno de *L. intermedia*.

Vale ressaltar a considerável melhoria no bem estar geral, observada através do comportamento, nos animais que receberam soro antiloxoscélico quando comparados com o controle que só recebeu veneno. A recuperação dos animais, assim como o processo de cicatrização da área necrótica ocorreu em menor tempo nos animais submetidos à soroterapia.

Adicionalmente, este trabalho possibilita uma nova avaliação dos manuais e protocolos técnicos utilizados no Brasil em relação ao tratamento do loxoscelismo, em especial ao utilizado em Curitiba, que sugere a aplicação de soro no máximo 36 horas após o envenenamento pela aranha marrom, porque até então não existiam evidências experimentais que confrontavam com a idéia de ausência de benefício terapêutico após este período. A ausência de estudos clínicos prospectivos, randomizados e cegos, bem como a compreensível dificuldade na realização de estudos dessa monta para avaliação de acidentes com animais peçonhentos, nos leva a utilização de modelos animais. Os coelhos utilizados neste experimento demonstraram claramente os benefícios do uso do soro loxoscélico mesmo quando aplicado 48 horas após o envenenamento. O fato de estes animais desenvolverem dermonecrose em torno de 12 horas após a inoculação do veneno, isto é, bem mais precocemente que em humanos, nos permite inferir que o soro mesmo quando aplicado após 36 horas em humanos deva apresentar benefício terapêutico.

## REFERÊNCIAS

- AKDENIZ, S.; GREEN, J.A.; STOECKER, W.V.; GOMEZ, H.F.; KEKLIKÇI S.U. Diagnosis of loxoscelism in two Turkish patients confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) and non-invasive tissue sampling. **Dermatol Online J.**, v.13, n.2, p.11, 2007.
- ALARIO, A., PRICE, G., STAHL, R., BANCROFT, P. Cutaneous necrosis following a spider bite: a case report and review. **Pediatrics**, v.79, n.4, p.618–621, 1987.
- ANDERSON, P.C.; Loxoscelism threatening pregnancy: five cases. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 65, p.1454–1456, 1991.
- BABCOCK, J.L.; SUBER, R.L.; FRITH, C.H.; GEREN, C.R. Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v.19, n.4, p.463–471, 1981.
- BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, n.11, p.1491–1497, 1996a.
- BARBARO, K.C.; SOUSA, M.V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **J. Protein. Chem.**, v.15, n.4, p.337–343, 1996b.
- BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., FAN, H.W., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, São Paulo, Sarvier, 2003. p.160–174.
- BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K.; Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v.45, n.4, p.489 – 499, 2005.
- BARRETT, S.M., ROMINE-JENKINS, M., FISHER, D.E. Dapsone or electric shock therapy of brown recluse spider envenomation? **Ann. Emerg. Med.**, v.24, n.1, p.21–25, 1994.
- BARRETTO, O.C.O., SATAKE, M., NONOYAMA, K., CARDOSO, J.L.C. The calcium-dependent protease of *Loxosceles gaucho* venom acts preferentially upon red cell band 3 transmembrane protein. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.3, p.309–313, 2003.



BINFORD, G.J.; WELLS, M.A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogygne spiders. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v.135, p.1, p.25–33, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAVO, L.M.; OVIEDO, I.L.; FARIAS, P.T.; SCHENONE, H..F. Estudio de la accion del suero anti-loxoscelico sobre los efectos hemolíticos e ulcero-necroticos producidos por el veneno de la araña *Loxosceles laeta*. **Rev. Méd. Chile**, v. 122, p.625-629, 1994.

BRAZ, A.; MINOZZO, J.C.; ABREU, J.C.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v.37, n.9, p.1323–1328, 1999.

DE BRITO, M.T.V; MARQUES, M.C.; DUARTE CORREIA, J.H.; SILVA-CARVALHO, L. **Caracterização de um modelo experimental de hipertensão portal**. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.99, n.552, p.199-205, 2004. Disponível em: [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12\\_2004/552\\_199\\_205.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2004/552_199_205.pdf). Acesso em: 10/04/2007.

CACY, J.; MOLD, J.W. The clinical characteristics of brown recluse spider bites treated by family physicians: an OKPRN Study. Oklahoma Physicians Research Network. **J. Fam. Pract.**, v.48, n.7, p.536–542, 1999.

CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D.G. Detection by enzyme immunoassay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.84, n.4, p.608–609, 1990.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA, R.B.; KALAPOTHAKIS, L.T.E.; OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied Pharmacology**, v. 211, p.64-77, 2006.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ZANETTI, V.C.; FERREIRA, A.P.; MINOZZO, J.C.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, v.36, n.4, p.563–569, 1998.

CHRISTOFF, A.O. **Efeitos do veneno e da toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles intermedia* em fígado de rato**. Dissertação de mestrado em farmacologia. Universidade Federal do Paraná, 2008

EICKSTEDT, V.R.D. Aranhas de importância médica no Brasil. In: BARRAVIEIRA, B., **Venenos animais: uma visão integrada**, Rio de Janeiro, EPUC, p.151–172, 1994.

ELGERT, K.D.; ROSS, M.A.; CAMPBELL, B.J.; BARRETT, J.T.; Immunological studies of brown recluse spider venom. **Infect. Immunity**, v.10, n.6, p.1412–1419, 1974.

EMANUELLI, M.P. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n1. p.251-255, 2007. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/3694/3456>. Acesso em: 15/12/2007.

ESCALANTE-GALINDO, P.; MONTOYA-CABRERA, M.A.; TERROBA-LARIOS, V.M.; NAVA-JUÁREZ, A.R.; ESCALANTE-FLORES, I. Loxoscelismo local dermonecrotico en niños mordidos por la araña *Loxosceles reclusa* (araña “violinista”). **Gac. Méd. Méx.**, v.135, n.4, p.423–426, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA (Farm. Bras.). **Monografias Soros Antipeçonhentos**. 4.ed., Parte II, Fascículo VI, 2005.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v.36, n.7, p.1039–1051, 1998.

FISCHER, M.L. Levantamento das espécies de *Loxosceles* HEINECKEN & LOWE, 1832, no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, v.03, n.32, p.63-88, 1994.

FURLANETTO, R.S. **Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico**. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1961.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.**, v.304, n.4, p.261–267, 1992.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (*Araneae, Scytodidae*). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.136, p.117–174, 1967.

GERTSCH, W.J.; ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indies (*Araneae, Loxoscelidae*). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.175, p.264–360, 1983.

GODDARD, J. Loxoscelism. Letter to the editor. **N. Engl. J. Med.**, v.339, n.26, p.1944–1945, 1998.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; TRACHY, J.W.; MARKS, R.M.; WARREN, J.S. Intradermal anti-loxosceles Fab. fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Acad. Emerg. Med.**, v.6, n.12, p.1195–1202, 1999.

GOMEZ, H.F.; KRYWKO, D.M.; STOECKER, W.V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. **Ann. Emerg. Med.**, v.39, n.5, p.469–474, 2002.

GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; DE OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; DA SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.37, n.4, p.627–632, 1998.

GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.3, p.425–426, 2003.

GUBERT, I.C. **Estudo epidemiológico dos acidentes com a aranha-marrom *Loxosceles intermedia* em Curitiba, Estado do Paraná, e avaliação do método de ELISA como ferramenta de diagnóstico.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil. 2005.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K.C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n.9, p.1333-1342, 2001.

EL HAFNY, B. Intraspecific variability and pharmacokinetic characteristics of *Androctonus mauretanicus mauretanicus* scorpion venom. **Toxicon**, v.40, n.11, p. 1609-1616, 2002.

HARM, A. The purification of antitoxic plasmas by enzyme treatment and heat denaturation. **Biochem. J.**, v. 43, p. 390-397, 1948.

HENRY, J.H. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods.** United States, Saunders, 2001.

HEBERT, G.A. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. **Appl. Microbiol.**, v.25, p.26-36, 1973.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann. Emerg. Med.**, v.44, n.6, p.608-624, 2004.

ISBISTER, G.K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. **Clin. Toxicol.**, v.41, n.3, p.291-300, 2003.

ISBISTER, G.K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, v.43, n.5, p.477-492, 2004.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; DE MOURA, J.F.; VEIGA, S.S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, v.50, n.7, p.938-46, 2007

KING JR., L.E. Brown recluse spider bites: stay cool. Letter to the editor. **JAMA**, v.254, n.20, p.2895-2896, 1985.

KRYWKO, D.M.; GOMEZ, H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: a comparison of 4 venom recovery methods. **Ann. Emerg. Med.**, v.39, n.5, p.475-480, 2002.

LEE, S.; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J.**, v.391(Pt 2), p.317-323, 2005.

LEÓN, G.; ROJAS, G.; LEMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Immunoglobulina G and Polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v.35, n.11, p.1627-1637, 1997.

LUCIANO, M.N.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; DOS SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. **J. Histochem. Cytochem.**, v.52, n.4, p.455-467, 2004.

MACHIAVELLO, A. Aracnoidismo cutâneo experimental com veneno glandular de *Loxosceles laeta*. **The Puerto Rican Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v.23, n.2, p.28-293, 1947.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed Loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.44, n.3, p.139-143, 2002.

MARQUES DA SILVA, E. **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1832, no período de 1993 a 2000**. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2002.

MASTERS, E.J.; SAMS, H.; KING JR., L.E. Loxoscelism. The author reply. **N. Engl. J. Med.**, v.339, n.26, p.1945-1946, 1998.

MELLO DA SILVA, C.A.; TORRES, J.B.; MARQUES, M.G.B.; NICOLELLA, A.D.R.; Aspectos epidemiológicos e clínicos de acidentes por *Loxosceles sp.* no Sul do Brasil. **Mem. Inst. Butantan**, v.52, p.80-81, 1990.

MILLER, M.J.; GOMEZ, H.F.; SNIDER, R.J.; STEPHENS, E.L.; CZOP, R.M.; WARREN, J.S. Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. **Am. J. Emerg. Med.**, v.18, n.5, p.626-628, 2000.

Ministério da Saúde, BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos** – Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Brasília, DF, p.45-56, 2001.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in Loxoscelism. **Toxicon**, v.40, p.409-418, 2002.

MONTGOMERY, D. **Desing and analysis of experiments**. 4.ed, New York, John Wiley & Sons, 2000.

MOLD, J.W.; Thompson, D.M. Management of brown recluse spider bites in primary care. **J. Am. Board. Fam. Pract.**, v.17, n.5, p.347–352, 2004.

OLVERA, A.; RAMOS-CEVILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALA, A.; ARRUIZ, M.S.; STOCK, R.P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, v.48, p.64-74, 2006.

DE OLIVEIRA, K.C.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; PIAZZA, R.M.; FERREIRA JR, J.M.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v.45, n.4, p.421–429, 2005.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL, M.H.; FILLUS NETO, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int. J. Exp. Path.**, v.84, p.287–294. 2002.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F.; OKAMOTO, C.K.; TAMBURGI, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J. Invest. Dermatol.**, v.127, n.6, 1410-8, 2007.

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; BUCHI, D.D.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R. The effect of Brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v.47, n.8, p.844-853, 2006.

PATEL, K.D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTYRE, T.M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **J. Clin. Invest.**, v.94, n.2, p.631–642, 1994.

PAULI, I.; PUKA, J.; GABERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in Loxoscelism treatment. **Toxicon**, v.48, n.2, p.123-137, 2006.

PHILLIPS, S.; KOHN, M.; BAKER, D.; VANDER LEEST, R.; GOMEZ, H.; MCKINNEY, P.; MCGOLDRICK, J.; BRENT, J. Therapy of brown spider envenomation: a controlled trial of hyperbaric oxygen, dapsone, and cyproheptadine. **Ann. Emerg. Med.**, v.25, n.3, p.363–368, 1995.

PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E.H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Pathologica**, p.23-33, 1957.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 8.5. American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>. Acesso em: 04/04/2008.

POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and protein in Immunesera. Heat denaturation after partial enzyme action. **Br. J. Exp. Pathol.** v.20, p. 201-212, 1939.

QUESENBERRY, K.E. Rabbits. In: **Saunders Manual of Small Animal Practice**. Birchard S.J. & Sherding R.G. (Eds). W.b. Saunders Company, Philadelphia, p.1346, 1994.

R – SOFTWARE, R: A language and environment for statistical computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006.

REES, R.; SHACK, R.B.; WITHERS, E.; MADDEN, J.; FRANKLIN, J.; LYNCH, J.B. Management of the brown recluse spider bite. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.68, n.5, p.768–773, 1981.

REES, R.S.; CAMPBELL, D.; RIEGER, E.; KING JR., L.E. The diagnosis and treatment of brown recluse spider bites. **Ann. Emerg. Med.**, v.16, n.9, p.945–949, 1987.

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONOLSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; DE CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles Heineken & Lowe* no estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan**, v.55, n.1, p.19–26, 1993.

DE ROODT, A.R.; SALOMÓN, O.D.; LLOVERAS, S.C.; ORDUNA, T.A. Envenenamiento por arañas del genero *Loxosceles*. **Medicina**, v.62, n.1, p.83–94, 2002.

DE ROODT, A.R.; ESTEVEZ-RAMIREZ, J.; LITWIN, S.; MAGAÑA, P.; OLVERA, A.; ALAGÓN, A. Toxicity os two North American *Loxosceles* (brown recluse spiders) venoms and their neutralization by antivenoms. **Toxicology**, v.45, p.678-687, 2007.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING JR., L.E. Necrotic arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.44, n.4, p.561–573, 2001.

SCHENONE, F.H.; SAAVEDRA, U.T.; ROJAS, S.A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos e experimentales. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.31, n.6, p.403–415, 1989.

SCHENONE, F.H.; RUBIO, A.S.; SAAVEDRA, U.T.; ROJAS, S.A. Loxoscelismo en pediatría. Región Metropolitana, Chile. **Rev. Chil. Pediatr.**, v.72, n.2, p.100–109, 2001.

SCHENONE, F.H. Cuadros tóxicos producidos por mordeduras de araña en Chile: latroductismo y loxoscelismo. **Rev. Méd. Chile**, v.131, n.4, p.437–444, 2003.

SCHULTZ, D.R., ARNOLD, P.I. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A proten, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. **Semin. Arthritis Rheum**, v.20, n.3, p.129-147, 1990.

Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, BRASIL. **Acidentes loxoscélicos – Protocolo técnico e fluxo de atenção em Curitiba**. Curitiba, Paraná, Brasil, p.1–38, 2002.

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, L.H.; PALUDO, K.S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles genus*) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v.26, n.3, p.210-8, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES JR., J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.92, n.5, p.546–548, 1998.

SIEGEL, S. and JOHN CASRELAN Jr., N. **Estatística não paramétrica para a ciência do comportamento**. 2. ed., Boockmaned, 2006.

**Sistema Nacional De Notificação de Agravos - SINAN**, Ministério Da Saúde, BRASIL, 2007.

DA SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; DOS SANTOS, F.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Hematological cell findings in boné marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.42, p.155-161, 2003.

DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v.44, n.7, p.693–709, 2004.

DA SILVEIRA, R.B.; DOS SANTOS FILHO, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VON DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v.40, n.6, p.815–822, 2002.

DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v.49, n.6, p.758-68, 2007.

SMITH, D.F., BALDWIN, G.A. Loxoscelism in Canada. The author reply. **Can. Med. Assoc. J.**, v.139, n.2, p.98–99, 1988.

DE SOUZA, A.L.; MALAQUE, C.M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C.C.; DUARTE, A.J.; SEGURO, A.C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v.51, p.151-156, 2007.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Medical progress: bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **N. Engl. J. Med.**, v.352, n.7, p.700-707, 2005.

SWANSON, D.L.; VETER, R.S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v.24, p.213-221, 2006

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W.; MORGAN, B.P.; DE ARAUJO, P.S.; ALVES, E.W.; SA SILVA, W.D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.251, n.1, p.366–373, 1998.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v.95, n.2, p.683-691, 2000.

TAMBOURGI, D.V.; PEDROSA, M.F.; DE ANDRADE, R.M.; BILLINGTON, S.J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C.W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Mol. Immunol.**, v.44, n.4, p.576-582, 2007.

TAVARES, F.L.; SOUZA-E-SILVA, M.C.C.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; REBECCHI, I.M.M.; SANO-MARTINS, I.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Human & Experimental Toxicology**, v.23, p.477-486, 2004.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v.41, p.541-557, 2003.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom proteins dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, v.37, p.587-607, 1999.

VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.38, n.6, p.825–839, 2000a.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI,



R.R.; GREMSKI, W. Effect of *Locosceles intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Histochem. J.**, v.32, p.397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, n.7, p.843–850, 2001.

ZANETTI, V.C.; SA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coag. Fibrinol.**, v.13, p.135-148, 2002.

ZAVALETA, A.M.V. Loxoscelismo, un problema de salud en el Peru. **Bol. Ofic. Sanit. Panamer.**, v.103, n.4, p.378–386, 1987.

WASSERMAN, G.S.; ANDERSON, P.C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.21, n.4–5, p.451–472, 1983–1984.

WENDELL, R.P. Brown recluse spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. **South. Med. J.**, v.96, n.5, p.486–490, 2003.

WONG, R.C.; HUGHES, S.E.; VOORHEES, J.J. Spider bites. **Arch. Dermatol.**, v.123, p.98–104, 1987.

WRIGHT, S.W.; WRENN, K.D.; MURRAY, L.; SEGER, D. Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. **Ann. Emerg. Med.**, v.30, n.1, p.28–32, 1997.

**ANEXOS**

ANEXO 1- ÁREA DERMONECRÓTICA EM CM<sup>2</sup> NOS COELHOS DOS GRUPOS  
CONTROLE VENENO E SOROTERAPIA EM DIFERENTES INTERVALOS DE  
TEMPOS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*

Coelhos	Controle Veneno	Soroterapia 06 h	Soroterapia 12h	Soroterapia 24 h	Soroterapia 36 h	Soroterapia 48 h
1	0,43	0	0,14	0,65	0,65	0,42
2	0,45	0,15	0,24	0,68	1,32	0,56
3	0,57	0,15	0,4	0,81	1,4	0,6
4	1,15	0,4	0,4	1,3	1,7	0,82
5	1,69	0,4	0,46	1,52	2,2	2,5
6	2,92	0,5	0,62	1,75	2,27	3,31
7	3,68	0,60	1,15	2,24	3,5	4,5
8	4,45	0,65	1,24	2,77	3,8	4,60
9	5,23	1,25	1,35	3,16	4,89	5,4
10	6,4	1,32	1,54	4,06	5,15	7,52
11	7,95	1,35	1,61	4,33	6,88	9,01
12	8,16	2,55	2,22	6,06	10,1	11,1
13	9,2	-	3,79	-	-	-
14	17	-		-	-	-
15	17,08	-		-	-	-
Média	5,76	0,78	1,17	2,44	3,65	4,19
EPM*	1,40	0,19	0,26	0,44	0,71	0,92

Área dermonecrótica apresentada em valores crescentes: medida a partir da crosta necrótica (em mm<sup>2</sup> e convertida para cm<sup>2</sup>) em sua maior área independente do tempo de avaliação nos grupos de coelhos controle veneno (2DMN *L. intermedia* ID no dorso) e grupos que receberam 4 mL IV de soro antiloxoscélico em 6, 12, 24, 36 e 48 h após a inoculação de mesma quantidade de veneno que o controle. \* Erro padrão da média

ANEXO 2- Certificado N° 126 do comitê de ética da Universidade Federal do Paraná

## Aspectos Éticos e de Biossegurança

### Autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa)



## CERTIFICADO

Nº 126

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no(a) Projeto de pesquisa abaixo especificado(a), estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).",

**TÍTULO:** "BIODIVERSIDADE, TOXINAS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS".

**AUTORES:** SILVIO SANCHES VEIGA – Coordenador

WALDEMIRO GREMSKI, OLDEMIR CARLOS MANGILI E

CÉLIA REGINA C. FRANCO – Colaboradores

**DEPARTAMENTO:** BIOLOGIA CELULAR

Curitiba, 10 de junho de 2005.

Prof. SILVIO MARQUES ZANATA  
Secretário

Profa. ANETE CURTE PERRAZ  
Presidente

ANEXO 3 – ARTIGOS PUBLICADO E SUBMETIDO DURANTE A  
REALIZAÇÃO DO MESTRADO

Review

# The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment

Isolete Pauli<sup>a,b,\*</sup>, Juliana Puka<sup>c</sup>, Ida Cristina Gubert<sup>d</sup>, João Carlos Minozzo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Production and Research Centre of Immunobiological Products, State Department of Health, Paraná, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Post-graduation in Biotechnological Processes, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil*

<sup>c</sup>*City Department of Health, Curitiba, Paraná, Brazil*

<sup>d</sup>*Department of Pathology, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil*

Received 1 September 2005; received in revised form 26 April 2006; accepted 8 May 2006

## Abstract

Loxoscelism or brown spider envenomation is the most important form of araneism in some countries and constitutes the third cause of accidents by venomous animals in Brazil. The treatment of *Loxosceles* bites is still controversial, with a variety of interventions proposed and tried, such as antivenom. The majority of clinical studies demonstrate a significant delay between a spider's bite and presentation for treatment, and this delay is thought to lead to an ineffective administration of a specific antivenom. Even in Brazil, where the antivenom therapy has been indicated more frequently than in other countries, there are still doubts about its real capacity to neutralize local and systemic effects of the envenomation and the ideal period for its administration. Thus, various studies in animal models have tried to correlate the time of envenomation with the application of the antivenom and the permanence of the venom in circulation or in dermonecrotic lesions. The purpose of this study was to evaluate the use of antivenom in loxoscelism treatment and to systematize the results of studies in animals and humans available in the last 30 years, making possible a more critical analysis of the efficacy of the antivenom or its therapeutic value in bites by spiders of the genus *Loxosceles*.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Loxosceles*; Loxoscelism; Brown spiders; Necrotic arachnidism; Antivenom therapy

## Contents

1. Introduction . . . . .	124
2. Treatment . . . . .	125
2.1. Antivenom treatment . . . . .	126
3. Studies in humans . . . . .	127
4. Studies in experimental models . . . . .	131
5. Discussion . . . . .	134
6. Conclusion . . . . .	135
References . . . . .	135

\*Corresponding author. Production and Research Centre of Immunobiological Products, State Department of Health, Paraná, Brazil.  
Tel./fax: +55 41 3673 8811.

E-mail address: [isops@ibest.com.br](mailto:isops@ibest.com.br) (I. Pauli).

## **Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the Brown spider (*Loxosceles intermedia*)**

**Isolete Pauli<sup>a,b</sup>, João Carlos Minozzo<sup>a</sup>, Paulo Henrique da Silva<sup>c</sup>,  
Olga Meiri Chaim<sup>c,d</sup>, Sílvia Sanches Veiga<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Production and Research Center of Immunobiological Products, State Department of Health, Paraná, Brazil. <sup>b</sup>Program of Biotechnological Processes, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil. <sup>c</sup>Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. <sup>d</sup>Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

### **Abstract**

Bites by the brown spider (*Loxosceles* spp.) are an important health problem in South America, where three species predominate (*L. laeta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*). Brown spider bites (loxoscelism) induce a block of cutaneous necrosis and, less commonly, may cause fatal systemic poisoning. A variety of controversial protocols are used to treat loxoscelism, while treatment with antivenin is the only venom specific treatment. Here we studied the action of the venom as well as the response to the antivenin for *Loxosceles* through an experimental study that simulates bites of *L. intermedia* (bites of this species are the most common in Brazil). Beneficial effects are known for antivenin applied quickly (within 4 h) after envenomation. Here we wished to examine the temporal development of the brown spider bite as well as the temporal patterns of the action of the antivenin to determine the time limits for beneficial use of the antivenin after envenomation. This information is important since most patients only appear for treatment several hours after being bitten. New Zealand rabbits were experimentally infected with venom from brown spiders by the injection of venom from *L. intermedia* (2x minimum necrotic dose), followed at regular time intervals by antivenin. The use of the loxoscelic antivenin - CPPI (4 mL per animal) minimized the effects of envenomation when applied for up to 12 h after the injection of the venom, as evaluated by cutaneous (erythema, edema, ecchymosis and necrosis) and systemic (blood cell and platelet counts, hematimetrics and fibrinogen dosage) criteria. Also, antivenin reduced the size of the necrotic area when applied up to 48 h after envenomation. Thus, therapy with loxoscelic antivenin – CPPI may provide beneficial results by interfering with envenomation well after the bite occurred and therefore may become an important tool for medical treatment of brown spider bites.

**Key words:** *Loxosceles*, loxoscelism, brown spider, necrosis, antivenin, antivenin therapy.